

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 14 MAY 2003

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

102 22 513.3

Anmeldetag:

17. Mai 2002

Anmelder/Inhaber:

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf,
Hamburg/DE

Bezeichnung:

Rekombinante virale Vektoren zur Tetracyclin-
regulierbaren Genexpression

IPC:

C 12 N 15/86

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 28. März 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident

Im Auftrag

Faust

BEST AVAILABLE COPY

UEXKÜLL & STOLBERG
PATENTANWÄLTE

BESELERSTRASSE 4
D - 22607 HAMBURG

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Martinistr. 52

20246 Hamburg

DR. J.-D. FRHR. von UEXKÜLL (- 1992)
DR. ULRICH GRAF STOLBERG (- 1998)

EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
EUROPEAN TRADEMARK ATTORNEYS
DIPL.-ING. JÜRGEN SUCHANTKE
DIPL.-ING. ARNULF HUBER
DR. ALLARD von KAMEKE
DIPL.-BIOL. INGEBORG VOELKER
DR. PETER FRANCK
DR. GEORG BOTH
DR. ULRICH-MARIA GROSS
DR. HELMUT von HEESCH
DR. JOHANNES AHME
DR. HEINZ-PETER MUTH
DR. MARTIN WEBER-QUITZAU
DR. BERND JANSSEN
DR. ALBRECHT von MENGES
DR. MARTIN NOHLEN
MÜNCHEN
DIPL.-ING. LARS MANKE
RECHTSANWALT IN HAMBURG
DR. FRANK DETTMANN

Mai 2002

(P 60239 We)

Rekombinante virale Vektoren zur Tetracyclin-
regulierbaren Genexpression

Die Erfindung betrifft rekombinante virale Vektoren, die durch Tetracyclin oder Tetracyclin-Derivate, wie z.B. Doxycyclin, hocheffizient supprimiert werden können, sowie deren Verwendung zur Durchführung einer Genexpression in Eukaryontenzellen, insbesondere im Rahmen einer Gentherapie.

Bösartige Erkrankungen sind eine der häufigsten Todesursachen des Menschen. Bei fortgeschrittenen und metastasierten soliden Tumorerkrankungen sind die therapeutischen Möglichkeiten immer noch sehr limitiert und das 5-Jahresüberleben vieler dieser Karzinomerkrankungen beträgt weniger als 10%. Daher stellt die metastasierte

Karzinomerkkrankung eine der größten Herausforderungen in der experimentellen Medizin dar. Durch Einschleusen therapeutischer Gene in Tumorzellen eröffneten gentherapeutische Ansätze neue Perspektiven in der Therapie dieser Erkrankungen.

Adenoviren ermöglichen den effizienten Transfer und die Expression therapeutischer Gene in verschiedene Gewebe und Zelllinien. Insbesondere die Weiterentwicklung rekombinanter adenoviraler Vektoren hat die experimentellen Ansätze in der adenoviralen Gentherapie maligner Erkrankungen ermöglicht (K. Kozarsky, Curr Opin Genet Dev 3 (1993) 499-503).

Mit der hohen Effizienz des Gentransfers sind gentherapeutische Ansätze heute häufig durch die Toxizität infolge unkontrollierter Transgenexpression limitiert. Insbesondere bei der adenoviral vermittelten Expression von Zytokinen wie Interleukin-2, Interleukin-12, Interleukin-18 oder Tumor Nekrose Faktor α kann es auch bei intratumoraler Gabe der rekombinanten Adenoviren zu unerwarteten erheblichen systemischen Nebenwirkungen kommen. Eine den konstitutiven Promotoren (Cytomegalovirus-Promotor) vergleichbare Genexpression nach erfolgter adenoviraler Infektion mit rekombinanten Vektoren konnte bislang nicht effizient kontrolliert werden.

Gegenwärtig stellt das von M. Gossen et al. entwickelte Tet-System eines der am meisten geeigneten Mittel zur Kontrolle der Genexpression dar (M. Gossen et al., PNAS USA 89 (1992) 5547-5551; M. Gossen et al. Science 268 (1995) 1766-1769). Das Tet-System basiert auf zwei Elementen des E. coli Tet-Operons. Das Tetracyclin-induzierbare Repressorprotein (tetR)

wird mit der transkriptionellen Aktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus VP16 fusioniert. Dieses tTA Fusionsprotein interagiert mit der heptamerisierten tetO Operatorsequenz, was in der transkriptionellen Aktivierung der flankierenden minimalen Promotoren resultiert. Die Bindung von Tetracyclin und dessen Derivaten an die TetR-Domäne von tTA inhibiert die Wechselwirkung des Fusionsproteins mit dessen Operatorsequenzen, was zur Herunterregulierung der Transgen-Expression führt.

Die Verwendung des ursprünglichen tet-regulierten Genexpressionssystems in rekombinanten adenoviralen Vektoren (TC Harding et al. J. Neurochem. 69 (1997) 2620-2623; TC Harding et al. Nat. Biotechnol. 16 (1998) 553-555) brachte zwei wesentliche Hindernisse mit sich. Die limitierte Verpackungskapazität resultierte in unzureichender Aktivierung des CMV minimalen Promotors durch Verstärkungsinterferenz (S. Rubinich et al. Gene Therapy 8 (2000) 875-885), und die konstitutionelle Transaktivator-Expression hatte eine mit VP16 zusammenhängende Toxizität zur Folge.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein für die Gentherapie von Tumorerkrankungen geeignetes Genexpressionssystem bereitzustellen, das die aus dem Stand der Technik bekannten Nachteile nicht aufweist. Insbesondere sollen (adeno-)virale Vektoren mit einem hohen Maß an Transgen-Expression bereitgestellt werden, die ferner die Möglichkeit bieten, dass diese Expression im Fall schwerwiegender Nebenwirkungen, die aus der Transgenexpression resultieren, effizient herunterreguliert

werden kann. Ferner sollen die Vektoren ein hohes Maß an Sicherheit bei der Anwendung aufweisen, insbesondere soll die aus dem Stand der Technik bekannte, mit VP16 zusammenhängende Toxizität vermieden werden.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch einen rekombinanten viralen, insbesondere adenoviralen Vektor gelöst, der ein Insert enthält, das die allgemeine Struktur

tTA - Intron¹ - TK⁺ - TetO₂ - CMV⁺ - Intron² - Transgen

aufweist, wobei

TetO ₂	der heptamerisierte Tetracyclin-Operator ist,
TK ⁺	der minimale Thymidin Kinase-Promotor ist,
tTA	eine Nukleinsäuresequenz ist, die für ein Fusionsprotein aus dem durch Tetracyclin induzierbaren Repressorprotein und der transkriptionellen Aktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus VP16 kodiert,
CMV ⁺	der minimale Cytomegalievirus-Promotor ist und
Transgen	eine für ein nicht-virales Protein kodierende Nukleinsäuresequenz ist,
Intron ¹	eine beliebige nicht-kodierende Nukleinsäuresequenz mit einer Länge von 0 bis etwa 1000 bp ist und
Intron ²	eine beliebige nicht-kodierende Nukleinsäuresequenz mit einer Länge von 0 bis etwa 1000 bp ist.

Für die Konstruktion der erfindungsgemäßen rekombinanten Adenoviren wurde das Tetracyclin induzierbare Repressor-Protein (tetR) mit der transkriptionellen Aktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus VP16 fusioniert. Im Vordergrund steht dabei nicht mehr die Inhibition durch Bindung des tetR an das Operon, sondern die Positionierung des VP16 Transaktivators. Entsprechend wurde für die vorliegende Erfindung auch ein heptamerisiertes TetO Operon mit zwei flankierenden Minimalpromotoren verwendet. Dieses System (Fig. 1) führt zur autoregulierten Transaktivator-Expression im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus über einen der Minimalpromotoren. Gleichzeitig wird ein therapeutisches Transgen über den anderen flankierenden Minimalpromoter exprimiert. Doxycyclin und Tetracyclin binden an die tetR-Komponente und eine Änderung der sterischen Konformation führt zu einem Verlust der Bindung des tetR an den Operator. Die Dissoziation des Transaktivators von den Minimalpromotoren hat dann eine Reduktion der Genexpression zur Folge.

Mit den erfindungsgemäßen Vektoren wurde erstmals ein replikationsdefizientes adenovirales System auf Basis eines Vektors erzeugt und charakterisiert, bei dem eine autoregulierte Transaktivator-Expression erfolgt. Dieses System ermöglicht eine sehr strenge Kontrolle der Transgen-Expression durch Zugabe von Doxycyclin in nicht-toxischen Konzentrationen. Die hohe Suppression der Genexpression wurde über einen weiten m.o.i.-Bereich (multiplicity of infection) und in verschiedenen Karzinomzelllinien erreicht.

Der Anteil der Suppression hängt von der verwendeten Konzentration des Antibiotikums ab. Da eine maximale

Suppression der Transgenexpression bereits bei Doxycyclin-Konzentrationen von 2 µg/ml erzielt wurden, sind die erfindungsgemäßen Vektoren bestens zur klinischen Anwendung geeignet.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung einen genannten Vektor, bei dem das Insert in umgekehrter Orientierung in das virale Vektorgenom inseriert ist, d.h. in der Form

5'-Transgen-Intron²-CMV⁺-TetO₇-TK⁺-Intron¹-tTA-3'.

Ebenso ist es möglich, daß ausschließlich oder zusätzlich die Positionen von tTA und Transgen im Insert vertauscht sind.

Soweit die Sequenzelemente 'Intron¹' und/oder 'Intron²' vorhanden sind (d.h. > 0 bp), kann deren Länge im Bereich bis zu etwa 1000 bp unabhängig voneinander variieren und z.B. jeweils bis etwa 750, bis etwa 500 oder bis etwa 250 bp betragen. In diesem Fall werden die Promotoren üblicherweise innerhalb der jeweiligen Intronsequenz liegen.

Gemäß einer weiteren Alternative kann das Insert zwischen 'CMV⁺' und 'Intron²' oder zwischen 'Intron²' und 'Transgen' zusätzlich einen lac-Repressor (lacR) enthalten, wodurch eine weitere Regulationsmöglichkeit geschaffen wird.

Das verwendete Transgen ist eine für ein Fluoreszenzprotein, für Luciferase, Interleukin-12 (IL-12), Interleukin-18 (IL-18), Interleukin-2 (IL-2), Tumor Nekrose Faktor α (TNF-α) oder Interferon-γ (IFN-γ) kodierende Nukleinsäuresequenz, vorzugsweise single-chain Interleukin-12. Die Erfindung

betrifft ferner Vektoren, bei dem einer der flankierenden Promotoren zur Expression eines Genes zur Apoptose-Induktion, zur Expression des BAX Genes, zur Expression des FAS-L Genes, eines Suizid-Genes, wie Thymidin-Kinase-oder Cytosin-Deaminase-Gen, oder eines β -Galaktosidase-Genes verwendet wird.

Hinsichtlich des verwendeten Virusrückgrats eignet sich insbesondere ein Adenovirus, ein Adenoassoziiertes Adenovirus (AAV), ein Retrovirus, insbesondere ein Humanes Immundefizienzvirus (HIV), ein Herpes Simplex Virus, ein Hepatitis-B Virus oder ein Hepatitis C-Virus, wobei Adenoviren besonders bevorzugt sind.

Bei dem erfindungsgemäßen Vektor ist das Insert in die E1-Region eines rekombinanten Adenovirus einkloniert, alternativ eignen sich auch die E3- und/oder die E4-Region.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform betrifft die Erfindung einen Vektor, der zum Beispiel durch homologe Rekombination eines viralen, insbesondere eines adenoviralen Plasmids und eines Expressionsplasmids mit der in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:3 dargestellten Nukleinsäuresequenz erhältlich ist. In diesem Zusammenhang steht "SEQ ID NO:" für die gemäß WIPO-Standard ST.25 verwendete Kennziffer <400>.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Expressionsplasmid mit der in SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:5 dargestellten Nukleinsäuresequenz sowie dessen Verwendung zur Herstellung eines oben genannten, erfindungsgemäßen Vektors.

Wie bereits erwähnt eignen sich die Vektoren zur *in vitro*-Genexpression in eukaryoten Zelllinien oder, wenn 'Transgen' für ein therapeutisch wirksames Protein kodiert, zur Verwendung in der Gentherapie. Beispielsweise kann 'Transgen' IL-12 oder IL-18 sein, wodurch sich der Vektor zur Gentherapie maligner Erkrankungen eignet. Bei den malignen Erkrankungen handelt es sich insbesondere um einen soliden Tumor.

Bei den zuvor genannten Verwendungen wird die Genexpression mit Tetracyclin oder Tetracyclin-Derivaten, insbesondere mit Doxycyclin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin, Demeclocyclin, Methacyclin oder Minocyclin, reguliert. Soweit vorliegend Doxycyclin erwähnt ist, wird der Fachmann die Übertragbarkeit des erfindungsgemäßen Prinzips auf die oben genannten Tetracyclin-Derivate erkennen.

Weitere Vorteile der Erfindung:

Im Vergleich zu einer durch den im Stand der Technik stark verwendeten konstitutiven humanen Zytomegalivirus (HCMV) immediate-early Promotor getriebenen Expression des IL-12-Heterodimers wird bei den im Rahmen der Erfindung entwickelten Konstrukten in einer großen Zahl von Krebszelllinien eine bis zu 4000-fach höhere Zytokin-Sekretion beobachtet. Dieser unerwartete Effekt wird auf das Zusammenspiel aus der Wahl der Promotors und der Verwendung von genetisch erzeugtem und hoch-sekretorischem, einzelkettigem IL-12 zurückgeführt. Die IL-12-Expression in Abwesenheit von Doxycyclin war überraschenderweise ebenfalls den zuvor bereits veröffentlichten adenoviral infizierten murinen Tumorzellen unter Verwendung des CMV-Promotors zu

Regulierung der Expression des heterodimeren oder einzelkettigen mIL-12 überlegen. Da die Transduktion humaner Tumorzellen im Vergleich zu zuvor berichteten Werten aus präklinischen oder klinischen Versuchen bei den erfindungsgemäßen Konstrukten ebenfalls signifikant höher ist, wird somit vorliegend ein weiterer, äußerst vorteilhafter Effekt erzielt. Durch die Möglichkeit, die adenovirale Dosis der erfindungsgemäßen Vektoren zu reduzieren, lassen sich nämlich Vektor-spezifische Nebeneffekte vermindern, was zu einer höheren Sicherheit in der klinischen Anwendung führt.

Im Hinblick auf die gemäß einer besonderen Ausführungsform genutzte Interleukin-12-Expression (siehe unten) haben die erfindungsgemäßen adenoviralen Vektoren ferner den Vorteil, daß sie alle Voraussetzungen zur erfolgreichen gentherapeutischen Krebsbehandlung erfüllen. So wird durch Expression des einzelkettigen Interleukin-12, das, verglichen mit der allgemein verwendeten heterodimeren Form, eine ähnliche Bioaktivität aufweist, die Bildung von inhibitorischen p40-Homodimeren vermindert, und durch die schnelle Regulation der Genexpression im erfindungsgemäßen 3r-System durch effiziente Sekretion des einzelkettigen Interleukin-12 sichergestellt. Die äußerst effiziente, Doxycyclin-vermittelte Suppression der Expression des bioaktiven, einzelkettigen Interleukin-12 trägt somit zur Sicherheit bei der gentherapeutischen Krebsbehandlung bei.

Das erfindungsgemäße System zeichnet sich ferner dadurch aus, daß eine westliche Standardernährung das sensitive tet-OFF-System nicht beeinflußt wird, so daß mögliche Belastungen der

Nahrung mit Spuren an Tetracyclin oder dessen Derivaten im klinischen Umfeld kein Problem darstellen.

Durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Vektoren ist die Anwesenheit von Transaktivatoren vor der Infektion mit den Vektoren nicht erforderlich, wodurch die Toxizität infolge der konstitutiven Expression des Transaktivators sowie eine gegenseitige Beeinflussung oder Störung der Transkription durch Doxycyclin-abhängige, autoregulative Genexpression vermieden wird. Demzufolge stellen die adenoviralen Vektoren der vorliegenden Erfindung ein wesentlich vielseitigeres und unaufwendigeres Hilfsmittel im Vergleich zu den im Stand der Technik bekannten Modellen der konstitutiven Transaktivator-Expression dar.

Ferner ist von Vorteil, daß die Doxycyclin-regulierte Genexpression nach adenoviraler Infektion einer großen Vielzahl nativer Säugerzelllinien oder Gewebe erfolgen kann. Die Autoregulation bewirkt ferner eine Beschränkung der ungewollten Transgen-Expression durch reduzierte Transaktivator-Expression bei Suppression durch Doxycyclin. Gegenüber den im Stand der Technik beschriebenen Ansätzen bieten die erfindungsgemäßen Vektoren den Vorteil, daß in Abwesenheit von Doxycyclin eine sehr hohe Transgen-Expression erreicht wird, während die Suppression der Transgen-Expression durch die Zugabe dieses Antibiotikums nicht beeinträchtigt wird, und bis zu 6000-fache Suppressions-Level erzielt werden.

Die erfindungsgemäßen Konstrukte lassen sich somit in vorteilhafter Weise zu Expression therapeutischer Transgene von bis zu 4,8 kB, einschließlich Apoptose-induzierender

Gene, verwenden und stellen damit ein wichtiges Mittel zur molekularen Therapie maligner Erkrankungen dar.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde ferner überraschenderweise festgestellt, daß die erfindungsgemäßen Vektoren eine mindestens 40-fach höhere Sensitivität gegenüber Tetracyclin aufweisen als die Detektionsgrenze in Standard-HPLC-Verfahren. Das erfindungsgemäße System eignet sich somit ferner als sensitiveres Hilfsmittel zum Nachweis sehr geringer Tetracyclinkonzentrationen in biologischen, lebensmittelchemischen oder ähnlichen Proben und ist somit beispielsweise zum Einsatz in der human- und veterinärmedizinischen Diagnostik geeignet (vgl. N. Schultze et al. Nat. Biotechnol. 14 (1996) 499-503). Das Transgen kodiert in diesem Fall für ein Reporterprotein, wie z.B. Luciferase oder ähnliches. Gegenstand der Erfindung ist somit ferner die Verwendung der erfindungsgemäßen Vektoren, bei denen 'Transgen' für ein Reporterprotein kodiert, zum Nachweis von Tetracyclin oder einem Derivat desselben, wie z.B. Doxycyclin, in biologischen, lebensmittelchemischen oder ähnlichen Proben.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen näher erläutert.

Beispiele

Zelllinien

HeLa und 293 humane embryonale Nierenzellen wurden in HGD MEM (Gibco, Rockville, MD) kultiviert. Humane RT-4 Blasenkrebszellen und humane Colon Adenokarzinomzellen HT29 wurden in McCoy-Medium (Gibco) gehalten. MCF-7 und BT-20 humane Brustkrebszellen sowie humane Colon (Colo 205 und SkCO-1) und pankreatische Adenokarzinom- (Aspc-1) Zelllinien ließ man in RPMI-Medium (Gibco) wachsen. HepG2 humane hepatozelluläre Karzinomzellen wurden in MEM-Medium (Gibco) gehalten. Zellen wurden kultiviert und gemäß Standardvorschriften aufgeteilt. Alle Medien waren mit 10% fötalem Rinderserum (FBS), 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco) und 1% Glutamin (Gibco) supplementiert. Die humane Myelomzelllinie U266 ließ man in RPMI-Medium wachsen, das mit 15% FBS (Clontech) und 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco) supplementiert war.

Beispiel 1

Plasmidkonstruktion

DNA-Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese getrennt und aus der Agarose mit dem Gel extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA) eluiert. DH5alpha-Zellen wurden zur Plasmidvermehrung eingesetzt. Plasmid-DNA wurde unter Verwendung eines modifizierten Protokolls für eine alkalische Lyse, gefolgt von einer Reinigung über eine kommerziell

erhältliche Ionenaustauschssäule nach Angaben des Herstellers (Qiagen), präpariert. Vor der Transfektion wurden LPS-Verunreinigungen in den Plasmid-DNA-Präparationen durch eine Triton X-117 Extraktionsmethode (M. Cotton et al., Gene therapy 1 (1994) 239-246) reduziert. Das Plasmid pBIG 3r, das das autoregulierte tTA Expressionssystem enthält, ist vorbeschrieben (C.A. Strathdee, Gene 229 (1999) 21-29). Die Luciferase cDNA wurde aus dem Plasmid pGL3basic (Promega, Madison, WI) durch BglII- und XbaI-Verdau erhalten und in pBIG 3r inseriert, das mit SpeI und BamHI gespalten wurde, was zur Erzeugung von pBIG 3r luc führte. Die adenovirale Plasmid pAd.CMV-Expressionskassette wurde durch Verdau mit XbaI und SalI nach Auffüllen mit T4 DNA-Polymerase entfernt. PBIG 3r luc wurde mit PvuII und SalI verdaut, und die Fragmente, die die bicistronische Expressionskassette enthielten, wurden in das Rückgrat von pAd.CMV-pA ligiert. Das resultierende adenovirale Plasmid pAd3r-luc enthielt die bidirektionale Expressionskassette, die an ihrem 5'-Ende durch die 1-456 bp des AD5-Genoms einschließlich Linker ITR und Verpackungssignale flankiert ist und die an ihrem 3'-Ende durch 3346-5865 bp des AD5-Genoms flankiert ist. Die von minimalen TK-Promotor getriebene Expression des tTA war antiparallel, und die durch den minimalen CMV-Promotor getriebene Expression des Luciferase-Gens war parallel zur adenoviralen El-Transkription. Das Luciferase-Gen wurde aus pGL3-basic durch Verdau mit KpnI/SalI freigesetzt und in das adenovirale Expressionsplasmid pAd.CMV-pA ligiert, was zu pAd.CMV-luc führte. Die cDNA des einzelkettigen murinen Interleukin-12 wurde aus pSFG.IL-12.p40.L.p35 (G.J. Lieschke et al. Nat. Biotechnol. 15 (1997) 35-40) nach Verdau mit NcoI und EcoRV erhalten. Dieses Fragment wurde in den NheI/SalI-Ort von pAd.3r-luc subkloniert und ersetzte das Luciferase-

Gen. Das nachfolgend verwendete Plasmid pAd.CMV.p40.IRES.p35 enthält die zwei murinen IL-12 Untereinheiten, die durch eine Internal Ribosome Entry Site (IRES) des Enzephalomyocarditis-Virus getrennt sind. Die Expression dieses Konstrukts steht unter der Kontrolle des humanen Zytomegalovirus (CMV) Promotor-Elements von -601 bis -14 relativ zum Transkriptionsstart.

Beispiel 2

Erzeugung und Amplifikation rekombinanter adenoviraler Vektoren

Rekombinate E1- und E3-deletierte Adenoviren wurden erhalten und Plaque-gereinigt nach Kalziumphosphat-vermittelter Cotransfektion von pAd.3r-luc, pAd.CMV-luc, pAd.3r-scIL-12 oder pAd.CMV.p40.IRES.p35 mit pBHG10 (AJ Bett et al., PNAS USA 91 (1994) 8802-8806). Die E1- und E3-deletierten Adenoviren wurden in 293-Zellen repliziert und durch CsCl-Zentrifugation wie zuvor beschrieben (FL Graham, Virology 54 (1973) 536-539) gereinigt. Die Titration der gereinigten Viren wurde mittels Plaque-Assay durchgeführt. Die resultierenden Titer für Ad.3r-luc, Ad.CMV-luc, Ad.3r^{sc}IL12 und Ad.CMV-p40.IRES.p35 waren $1,0 \times 10^{10}$ p.f.u./ml (plaque forming units pro ml), $7,5 \times 10^9$ p.f.u./ml, $6,7 \times 10^9$ p.f.u./ml und $8,0 \times 10^9$ p.f.u./ml. Virale DNA wurde erhalten (Qiagen DANN Blood Kit) zur Sequenzanalyse, um die Insertion, die Transaktivator-Sequenz und die Orientierung zu bestätigen.

Beispiel 3

In vitro adenovirale Transfektion

HT29, Colo205, SkCO-1, AsPc-1, HepG2, MCF-7, BT-20, HeLa, RT4 und U266 Zellen wurden in Platten mit sechs und zwölf (U266) Kavitäten bei einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro Kapazität 6 Stunden vor der Transfektion gesät. Die größeren HeLa-, RT-4- und 293-Zellen wurden bei einer Konzentration von 5×10^5 Zellen pro Kapazität gesät. U266-Myelomzellen wurden in Suspensionskultur wachsen gelassen und infiziert. Gereinigte virale Partikel wurden in Medien ohne Supplementierung verdünnt, und die Zellen wurden 500 μ l der geeigneten Virusverdünnung pro Kapazität für 1 Stunde ausgesetzt. Nach Entfernung des infektiösen Überstands wurden vollständige Medien, die mit unterschiedlichen Konzentrationen von Doxycyclin supplementiert waren, zugefügt. Die Medien wurden alle 24 Stunden gewechselt.

Beispiel 4

Quantifizierung der Transgen-Expression

24 Stunden nach Infektion mit Ad.CMV-luc oder Ad.3r-luc wurden die Zellen mit 150 μ l Zellkultur-Lysisreagens nach den Angaben des Herstellers (Promega) geerntet. Die Luciferase-Aktivität in 20 μ l Zell-Lysat wurde unter Verwendung eines Bertold LB9507 Luminometers und Luciferase-Assaysubstrat (Promega) gemessen. Die Standardkurven wurden unter Verwendung von rekombinanter Leuchtkäfer-Luciferase (Promega), das mit CCLR auf Konzentrationen von 1 pg/ml bis

300 ng/ml verdünnt war, erzeugt. Da die rlu bei höheren Konzentrationen ein Sättigungsprofil zeigen, wurde ein 2-Phasen exponentielles Assoziations-Kurvenfitting unter Verwendung des Prism Software-Pakets (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde unter Verwendung des DC-Protein-Assaykits (BioRad, Hercules, CA) bestimmt.

Die Quantifizierung des einzelkettigen und heterodimeren mIL12 in zellfreiem Überstand nach adenoviraler Infektion von Tumorzellen wurde durch einen IL12 p70 ELISA (OptEIA™, Pharmingen) durchgeführt, wobei gleiche Immunreaktivität und Molekulargewicht für beide Formen angenommen wurde. Splenozyten wurden mit Hilfe von Standardverfahren isoliert. Gehirnzellen wurden dann für drei Tage mit RPMI 1649 kultiviert, das mit 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Glutamin in anti-Maus CD3-beschichteten Kolben in Gegenwart von anti-human CD28 (5µg/ml) kultiviert, um T-Zellen anzureichern und die mIL-2-Sekretion zu stimulieren. Die Bioaktivität wurde nach Zugabe von 50-fach verdünntem konditionierten Überstand aus Ad.3r-scIL12 (+/- Doxycyclin), Ad.CMV-p40.IRES.p35 und mock-infizierten HT29-Zellen zu 4×10^4 murinen Splenozyten in einem finalen Volumen von 125 µl für 24 Stunden bestimmt. Murines IFN-γ wurde in Splenozyten-freiem Überstand unter Verwendung eines IFN-γ ELISA (OptEIA™, Pharmingen) quantifiziert. Um die spezifische Bioaktivität zu bestimmen, wurden halblogarithmische Verdünnungen von konditioniertem Überstand von beiden Formen des adenoviral exprimierten mIL-12 und Baculovirus-exprimiertem, gereinigtem mIL12 (R&D systems) auf mIL-12-Immunreaktivität (p70 ELISA) und IFN-γ-Induktion in Splenozyten wie beschrieben getestet. Die Bioaktivität von adenoviral exprimiertem heterodimerem

IL-12 kann durch die Bildung inhibitorischer p40-Homodimerer wie anderweitig beschrieben reduziert werden. Es wurde vorliegend kein Capture-Bioassay verwendet, um potentiell niedrigere Bioaktivität in vivo zu reflektieren.

Beispiel 5

Alternative Klonierungsstrategie

Klonierung von adenoviralen Expressionsplasmiden für die Virussyntese mittels AdEasy System

Als Alternative zu der beschriebenen Virussyntese wurden adenovirale Expressionsplasmide entwickelt, die eine Virusgeneration mittels AdEasy®-System (Stratagene) ermöglichen. Dazu wurde der pShuttle Vektor (Stratagene) mit KpnI verdaut, gebluntet, und nachfolgend mit SalI verdaut. Das 3r-Insert wurde aus pBIG3r mittels Verdau mit PvuII und SalI isoliert und in den pShuttle ligiert. Das resultierende Plasmid pShuttle3r ermöglicht die einfache Generation verschiedener adenoviraler Vektoren zur Doxzyzyklin-supprimierbaren Genexpression. Das humane Single-Chain Interleukin-12 kann nachfolgend mittels XhoI in die multiple cloning site des pShuttle3r kloniert werden und resultiert in pShuttle3r-hscIL12 (siehe Abbildung).

Die Virusgeneration erfolgt dann durch homologe Rekombination mit pAdEasy-1® in BJS183 E. coli-Zellen und Selektion für Kanamycin. Nach Transfektion von 293 Zellen mit dem Rekombinationsprodukt entstehen in diesem System replikative rekombinante adenovirale Vektoren (T He, S Zhou et al. Proc Natl Acad Sci USA 95 (5): 2509-14).

Die Virusproduktion erfolgt dann wie vorbeschrieben in 293-Zellen.

Beispiel 6Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und Immunblotting

Nach Infektion von HT29-Colon Krebszellen wurden Lysate auf 15% Acrylamid SDS-Gele nach Kochen in Laemmli-Probenpuffern unter reduzierenden Bedingungen geladen. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine auf 0,45 μ m Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA) transferiert und mit TBS-enthaltender 5% nicht-fetter Trockenmilch für 1 Stunde geblockt. Actin und das Fusionsprotein tTA wurden unter Verwendung eines Kaninchen anti-Actin Affinitäts-isolierten Antigen-spezifischen Antikörpers (#A2066, Sigma, St. Louis, MS) und eines Maus anti-TetR monoklonalen Antikörpers (M. Gossen et al., PNAS USA 89 (1992) 5547-5551) (#8632-1, Clontech) nachgewiesen. Nach Inkubation für 1 Stunde wurden die Blots mit TBS-enthaltendem 0,1% Tween-20, pH 7,5, gewaschen und mit anti-Kaninchen und anti-Maus Peroxidase-verknüpften sekundären Antikörpern (Dianova, Hamburg, Deutschland) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Proteine wurden schließlich nach Waschen und Chemolumineszenz-Nachweis (SA Nesbitt et al. Anal. Biochem. 206 (1992) 267-272) (ECL, Amersham, Buckinghamshire, UK) nach Vorschrift des Herstellers visualisiert.

Beispiel 7Tetracyclin-Screening von Blutspender-Seren

Eine Frau und sieben Männer im Alter zwischen 23 und 35 Jahren wurden als Probanden ausgewählt. Sie hatten für

mindestens einen Monat keine antiinfektiöse Behandlung erhalten. Alle waren gesund und unter einer westlichen Standardernährung. 50 ml peripheren venösen Bluts wurden entnommen, und das Serum wurde nach Standardverfahren erhalten. Die Seren unterliefen einem Gefrier-Auftau-Zyklus, bevor die Zellkultur-Experimente und Tetracyclin-Bestimmungen durchgeführt wurden. Humane Seren wurden anstelle von FBS den Zellkulturmedien zugegeben. Tetracyclin-HCl wurde von Fluca Chemicals (Fluca, Germany) gekauft. Bakerbond RP-18 Festphasenextraktions (SPE)-Säulen wurden von Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, NJ) erhalten, Lösungsmittel in HPLC-Qualität und andere Chemikalien wurden von Merck (Whitehouse Station, NJ) gekauft. HPLC wurde an Constametric 3500 MS und RP-18 HyPURITY[®] ADVANCE-Säulen von ThermoQuest (Deutschland) durchgeführt. Die Datenanalyse erfolgte unter Verwendung von Chemstation Software von Agilent (Deutschland) nach Vorkonditionierung der RP-18-Säulen mit 2 x 1 ml Methanol, gefolgt von 2 x 1 ml Wasser, wurden 3 ml Serum, das 0,1 mol/l Citratpuffer (pH 6,8) und 0,1 mol/l EDTA enthielt, bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min. zugegeben. Die Säulen wurden dann mit 10 ml Wasser und 1 ml Methanol gewaschen. Tetracyclin wurde mit 4 ml Methanol, das 0,1% Trifluoressigsäure enthielt, eluiert (ME Sheridan et al. J. Chromatography 434 (1988) 253-258). Das Eluat wurde getrocknet und in 100 µl 0,01% Oxalsäure in Wasser/Acetonitril (98/2 v/v) bei einem mit HCl eingestellten pH-Wert von 2,0 rekonstituiert. Die Chromatographie wurde bei Raumtemperatur und einer Fließgeschwindigkeit von 0,9 ml/min. durchgeführt. Die Fluoreszenz bei 416 nm (Anregung) und 515 nm (Emission) wurde durch Komplexierung des Tetracyclins mit 0,2% (w/v) Zirkonium(IV)chlorid erreicht (K. De Wasch et al. Analyst 123 (1998) 2737-2741). Die Kalibrierung wurde mit

wässrigen Lösungen von Tetracyclin HCl von 2 bis 100 ng/ml mit Variationskoeffizienten von 6,3% (während eines Tages) und 8,5% (von einem Tag auf den anderen) für 10 ng/ml durchgeführt.

Resultate

Konstruktion von Doxycyclin-supprimierbaren, auto-regulierten adenoviralen Vektoren

Adenovirale Expressionsplasmide, die das Luciferase- und murine scIL-12-Gen unter Kontrolle des Tetracyclin-supprimierbaren autoregulierten Systems enthielten, pAd.3r-luc und pAd.3r-scIL-12 wurden erzeugt. Nach einem gleichen Verfahren wurden Plasmide erzeugt, die das Luciferase-Gen und die cDNA, die für murines p40 und p35, das durch einen Internal Ribosome Entry Site (IRES), jeweils unter Kontrolle des Zytomegalivirus (CMV)-Promotors, enthalten. Rekombinate E1/E3-deletierte Adenoviren Ad.3r-luc, Ad.3r-scIL12, Ad.CMV-luc und Ad.CMV-p40.IRES.p35 (Figur 2) wurden durch Cotransfektion adenoviraler Expressionsplasmide mit pBHG10 erzeugt. Die Plaque-Reinigung und Amplifizierung wurde in 293-Zellen durchgeführt. Adenovirale Titer wurden durch Standard-Plaque-Assay-Techniken quantifiziert. Isolierung, Amplifikation und Plaque-Assay von Ad.3r-scIL12 war in Gegenwart von 2 µg/ml Doxycyclin bis zu 87-fach höher, was auf die Toxizität nicht supprimierter scIL12-Expression in 293-Zellen hinweist (Figur 3). Im Gegensatz dazu hatte Doxycyclin keinen Einfluß auf die Titrierung von Ad.3r-luc.

Dosis-abhängige Doxycyclin-regulierte Luciferase- und Transaktivator-Genexpression

Humane Colon-Krebszellen HT29 sind gegenüber adenoveraler Transduktion äußerst empfänglich, wie bereits zuvor gezeigt (A. Block et al. Cancer Gene Therapy 7 (2000) 438-445). Diese Zellen wurden mit Ad.3r-luc bei einer m.o.i. (multiplicity of infection) von 30 nach Inkubation mit Doxycyclin bei verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden infiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde in Zelllysaten entsprechend dem gelösten Zellprotein bestimmt. Bereits geringe Doxycyclin-Konzentrationen wie 100 pg/ml führen zu einer signifikanten Reduktion der Genexpression. Die Genexpression wurde schließlich mit Doxycyclin-Konzentrationen von bis zu 3 µg/ml maximal supprimiert (Figur 4). Diese Doxycyclin-Konzentration wird üblicherweise in der klinischen Behandlung bakterieller Infektionen verwendet. Im vorliegenden experimentellen Ansatz lag eine bis zu 2400-fache Doxycyclin-vermittelte Suppression der Transgen-Expression vor.

Die dosis-abhängige, Doxycyclin-regulierte Supression der positiven Feedback-Schleife (Figur 1) wurde durch Nachweis der tTA Fusionsproteine mit Tet-R monoklonalen (M. Gossen et al., PNAS U.S.A. 89 (1992) 5547-5551) und VP16 polyklonalen Antikörpern (PE Pellett et al. PNAS U.S.A. 82 (1985) 5870-5874) in Western Blot-Analysen illustriert (Figur 5). Steigende Doxycyclin-Konzentrationen führten zu einer Herunterregulierung der intrazellulären tTA-Anteile, was mit einer verminderten Luciferase-Genexpression korreliert.

M.O.I.-abhängige, supprimierbare Luciferase-Expression

HT29-Zellen wurden mit Ad.3r-luc bei einer m.o.i. im Bereich von 0,1 bis 100 nach Inkubation in Gegenwart oder Abwesenheit von Doxycyclin bei 2 $\mu\text{g/ml}$ für 24 Stunden infiziert. Die Suppression der Luciferase-Gen-Expression in Lysaten von Ad.3r-luc-infizierten HT29-Zellen bewegte sich von 470 (m.o.i.: 0,3) bis 2400-fach (m.o.i.: 10 - 100) (Figur 6). Das Ausmaß der Suppression blieb bei hohen m.o.i. konstant, was für eine ausreichende, mit der Transgen-Expression zusammenhängende Toxizitätskontrolle entscheidend ist. Doxycyclinkonzentrationen von 2 $\mu\text{g/ml}$ störten die adenovirale Genexpression in HT29-Zellen unter Verwendung des konstitutiven CMV-Promotors nicht. Um die Effizienz der Ad.3r-luc-vermittelten transgenen-Expression in Abwesenheit von Doxycyclin zu untersuchen, wurde die Expression mit der Expression in HT29-Zellen verglichen, die mit Ad.CMV-luc infiziert waren (Figur 7). In HT29 zeigte Ad.3r-luc eine höhere Genexpression als Ad.CMV-luc über alle getesteten m.o.i. (1 - 100), wobei der Faktor zwischen 18-fach (m.o.i.:100) und 240-fach (m.o.i.:1) lag.

M.O.I.-abhängige regulierte Expression des einzelkettigen murinen Interleukin-12

HT29-Zellen wurden mit Ad.3r-scIL-12 bei einer m.o.i. im Bereich von 1 bis 100 infiziert und in Gegenwart oder Abwesenheit von 2 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin für 24 Stunden inkubiert. Die Genexpression von ScIL-12 wurde um mehr als 1400-fach bei einer m.o.i. von 100 in Gegenwart von Doxycyclin suprimiert (Figur 8). Die Western Blot-Analyse zeigte eine mit der IL-12 Expression korrelierende Transaktivator (tTA)-Expression

(Figur 9). Nicht-supprimierte 3r-vermittelte IL-12 Genexpression war 11-fach (m.o.i.:1) bis 375-fach (m.o.i.:100) höher als unter Verwendung des konstitutiven CMV-Promotors, wobei von gleicher Immunreaktivität des p70-ELISA gegenüber dem einzelkettigen Interleukin-12 und der CMV-gesteuerten Expression eines p40/p35-Heterotrimer ausgegangen wurde. Die Bioaktivität beider Formen wurde durch Inkubation muriner Splenocyten mit 50-fach verdünnten konditionierten Medien nach Infektion von HT29 mit IL-12 exprimierenden Adenoviren quantifiziert (Figur 10). Es wurde eine hohe Interferon- γ (IFN- γ)-Sekretion der Splenocyten durch Inkubation mit konditionierten Medien nach Infektion von HT29 mit Ad.3r-sc-IL-12 erhalten. Diese IFN- γ -Induktion war verglichen mit der Infektion von HT29 mit dem gewöhnlich verwendeten Ad.CMV-p40.IRES.p35 signifikant höher. Die Zugabe von Doxycyclin resultierte in einer Suppression von IFN- γ auf einen Hintergrund-Level. Ferner wurde die spezifische Bioaktivität adenoviral exprimierter Formen von IL-12 im Vergleich zu rekombinant gereinigten p40/p35-Heterodimeren analysiert (Figur 11). Murine Splenocyten wurden mit halblogarithmischen Verdünnungen von rekombinant heterodimerem IL-12 oder konditionierte Medien enthaltendem IL-12 wie beschrieben inkubiert. Die IFN- γ -Induktion korrelierte mit der Immunreaktivität von IL-12 in den Medien, wie durch p70-ELISA nachgewiesen wurde. Die basale Induktion wurde durch Präinkubation von Splenocyten mit Anti-humanen CD28-Antikörpern verursacht, was zur IL-2-Expression und nachfolgenden IFN- γ -Induktion führte (CH June et al., J. Immunol. 143 (1989) 153-161). Die Bioaktivität des murinen einzelkettigen IL-12 Fusionsproteins war mit dem gereinigten, rekombinanten p40/p35-Heterodimer vergleichbar. Die

reduzierte Bioaktivität von IL-12, das nach Infektion mit dem gewöhnlich verwendeten Ad.CMV-p40.HRES.p35 exprimiert wurde, erklärt sich durch inhibitorische p40-Homodimere (P. Ling et al J. Immunol. 154 (1995) 116-127; S. Gillesen et al. European J. Immunol. 25 (1995) 200-206; F. Mattner et al. European J. Immunol. 23 (1993) 2202-2208).

Regulierte Interleukin-12 Genexpression *in vitro*

Verschiedene Zelllinien des humanen Colon Karzinom (HT29, SkCo-1 und Colo205), pankreatischen Karzinom (Aspc-1), Blasen-Karzinom (RT4), Cervix-Karzinom (HeLa), Brust-Karzinom (MCF-7 und BT-20) sowie Myelom (U266) und hepatozelluläres Karzinom (HepG2) wurden entweder mit Ad. CMV.p40.IRES.p35 oder Ad.3r-scIL-12 infiziert und in Gegenwart oder Abwesenheit von Doxycyclin inkubiert. Die Expression des rekombinanten Interleukin-12 wurde unter Verwendung eines p70-ELISA wie zuvor beschrieben bestimmt (Figur 12). Die Doxycyclin-vermittelte Suppression der Interleukin-12-Expression trat in allen Zelllinien auf. In Abwesenheit von Doxycyclin erwies sich der 3r-Promotor gegenüber dem CMV-Promotor in allen Zelllinien mit Ausnahme der U266-Myelomzelllinie als überragend. Die Interleukin-12-Expression in Mock-transfizierten Zelllinien wurde nicht nachgewiesen. Die Suppression des IL-12 war 3,9-fach in U266 und bewegte sich von 167 (HepG2) bis 6000-fach (Aspc-1). Mit Ausnahme von U266, wo eine gegenüber der CMV-vermittelten IL-12-Expression signifikant geringere 3r-vermittelte IL-12 Expression vorlag, führte der 3r-Promotor in allen anderen Krebszelllinien zu 17-fach (SkCo-1) bis 4254-fach (Colo205) höherer Genexpression in Abwesenheit von Doxycyclin.

Regulierte Genexpression nach Inkubation mit Humanserum

In Abetracht der geringen Doxycyclin- und Tetracyclin (tet)-Konzentrationen, die zur Suppression der Transgen-Expression erforderlich sind, wurde die Regulation in humanen Colon-Krebszellen in Gegenwart von humanem Serum untersucht, um die Anwendbarkeit dieses Ansatzes in einem möglichen klinischen Umfeld zu prüfen. Serumproben von gesunden Probanden, die sich einer westlichen Standardernährung unterzogen, wurden unter Verwendung eines Standard HPLC-Verfahrens mit einer maximalen Sensitivität von 2 ng/ml auf Tetracyclin getestet, da Tetracyclin in der Nutztierhaltung breite Anwendung findet und eine Kontamination von Nahrungsmitteln anzunehmen ist. Die HPLC zeigte keine signifikanten Tetracyclin-Konzentrationen in allen getesteten Proben. HT29-Colon-Karzinomzellen, die nach Inkubation mit diesen humanen Seren mit Ad.3r-luc (m.o.i.: 30) infiziert wurden, zeigten keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Transgenexpression verglichen mit zertifiziertem, Tetracyclin-freiem fötalem Rinderserum (Figur 13). Diese Beobachtung spiegelt Tetracyclin-Konzentrationen in humanen Serumproben von weniger als 10 pg/ml wieder. Wie erwartet, führte die Supplementierung dieser Humanseren mit Doxycyclin ($2,5 \mu\text{g/ml}$) zu einer äußerst effizienten Suppression der Transgen-Expression.

Beschreibung der Figuren

Figur 1. Prinzip einer autoregulierten, Tetracyclin-abhängigen Transaktivator-Expression. Der bidirektional tet-responsive Promotor kontrolliert sowohl das Transgen als auch die Transaktivator-Expression. Bindung des Transaktivators in Abwesenheit von Tetracyclin oder Doxycyclin resultiert in einer Amplifikation der Transaktivator-Expression durch eine positive Feedback-Schleife, ebenso wie in einer Induktion der Transgen-Expression. tTA, Tet-Repressor und VP16 Fusionsproteine; TKmin, minimaler Thymidin-Kinase-Promotor; CMVmin, minimaler Zytomegalovirus-Promotor; TetO₇, heptamerisierter Tet-Operator.

Figur 2. Adenovirale Vektorkarten. Die autoregulierte Tetracyclin-Expressionskassette ist in die Δ E1-Region des adenoviralen Genoms inseriert. Zur Vermeidung von kryptischem Splicing und um RNA-Stabilität zu erhalten (Ad.3r-luc und Ad.3r-scIL12) wurde ein Intron aufwärts vom Aktivator und dem Luciferase- oder Interleukin-12-Gen aus der Maus eingefügt. Zusätzlich wurden rekombinate adenovirale Vektoren für die Expression des Luciferase- oder des heterodimeren Interleukin-12-Gens der Maus unter der Kontrolle des CMV-Promotors konstruiert (Ad.CMV-luc und Ad.CMV-p40.IRES.p35). E1 und E3, Early regions des adenoviralen Genoms; IRES, interne Ribosomen-Eintrittsstelle; CMV, Zytomegalievirus-Promotor; TK, Thymidin-Kinase-Promotor.

Figur 3. Plaque-Assay von Ad.3r-scIL12 in An- und Abwesenheit von Doxycyclin in einer Konzentration von 2 μ g/ml. Titration von Ad.3r-scIL12 in 293-Zellen resultiert in einer erheblich

höheren Ausbeute, wenn die Expression des Transgens durch Zugabe von Doxycyclin unterdrückt wird. Dox, Doxycyclin.

Figur 4. Dosisabhängige Luciferase-Expression nach Infektion von HT29 Dickdarmkrebszellen mit Ad.3r-luc gefolgt von verschiedenen Konzentrationen des Tetracyclin-Derivats Doxycyclin.

Figur 5. Westernblot-Analysen des Transaktivators zeigen die positive Rückkoppelungsschleife nach adenoviraler Infektion von HT29-Zellen unter Inkubation mit unterschiedlichen Mengen von Doxycyclin. Die Figur zeigt die Unterdrückung der Expression des tTA Fusionsproteins in Anwesenheit von Doxycyclin. dox, Doxycyclin.

Figur 6. Unterdrückung der Luciferase-Genexpression nach Infektion von HT29-Zellen mit verschiedenen Multiplizitäten der Infektion (multiplicities of infection, m.o.i.). Doxycyclin-regulierte Genexpression wird in einem großen Infektionsbereich von wenigstens 0,1 bis 100 m.o.i. erzielt, die in einer 470- bis 2400-fachen Unterdrückung der Luciferase-Expression resultiert.

Figur 7. Vergleich der 3r-vermittelten Transgen-Expression bei Verwendung des konstitutiven Zytomegalievirus-Promotors. HT29-Zellen wurden mit Ad.3r-luc oder Ad.CMV-luc in verschiedenen m.o.i. infiziert, gefolgt von einer Inkubation in Doxycyclin-freiem Medium.

Figur 8. Interleukin-12-Expression in HT29-Zellen nach Infektion mit Ad.3r-scIL12 in An- oder Abwesenheit von Doxycyclin (2 µg/ml) oder Ad.CMV-mIL12 bei verschiedenen

m.o.i. Wie mit Luciferase-exprimierenden adenoviralen Vektoren gezeigt wurde, befindet sich in HT29 eine erheblich höhere Interleukin-12-Expression, wenn der 3r-Promotor verwendet wird. Zugabe von Doxycyclin führt zu einer Unterdrückung der Transgen-Expression unter das Niveau, das mit Ad.CMV-p40.IRES.p35 bei der selben m.o.i. erzielt wird.

Figur 9. Westernblot-Analyse der tTA Transaktivator-Genexpression in An- oder Abwesenheit von Doxycyclin nach Infektion mit Ad.3r-scIL12 bei verschiedenen m.o.i.. Beide Domänen des tTA Fusionsproteins wurden mit den TetT- und VP16-Antikörpern nachgewiesen. Die Expression des tTA Fusionsproteins korreliert mit der eingesetzten m.o.i.. Zugabe von Doxycyclin in einer Konzentration von 2 µg/ml resultiert in einer Unterdrückung der tTA Expression. TetR, Tetracyclin-Repressor; VP16, Herpes simplex Virus transkriptionale Aktivierungsdomäne.

Figur 10. Induzierung der Interferon-γ-Expression nach Inkubation von Splenozyten mit konditioniertem Überstand von infizierten HT29-Zellen. 10⁶ HT29-Zellen wurden mit Ad3r-scIL12 (+/- Dox) oder Ad.CMV-p40.IRES.p35 bei einer m.o.i. von 30 für 24h infiziert. Infektion von HT29 mit Ad.3r-scIL12 resultiert in einer starken Interferon-γ-Induktion im Vergleich zu einer Infektion mit Ad.CMV-p40.IRES.p35. Zugabe von Doxycyclin resultiert in einer Abnahme des Interferon-γ auf Hintergrundniveau in diesem Versuchsansatz.

Figur 11. Vergleich der Interferon-γ-Induktion durch adenoviral-exprimiertes Einzelketten- (single-chain), bzw. heterodimeres Interleukin-12, sowie durch aufgereinigtes rekombinantes Interleukin-12. Interleukin-12 im

konditionierten Überstand von infizierten HT29-Zellen wurde durch p70-mIL12 ELISA bestimmt. Mäuse-Splenozyten wurden dann mit seriellen Verdünnungen von entweder adenoviral exprimierten oder rekombinanten Interleukinen inkubiert und das induzierte Interferon- γ wurde mit mIFN- γ ELISA quantifiziert. Die Bioaktivität-Immunoreaktivität von Einzelketten-Interleukin-12 war vergleichbar zu rekombinantem aufgereinigtem heterodimerem Interleukin-12. Die spezifische Bioaktivität von adenoviral produziertem heterodimerem Interleukin-12 (Ad.CMV-p40.IRES.p35) scheint niedriger zu sein, wahrscheinlich durch inhibitorische p40 Homodimere.

Figur 12. Interleukin-12-Expression in verschiedenen Zelllinien nach Infektion mit entweder Ad.CMV-p40.IRES.p35 oder Ad.3r-scIL12 in An- oder Abwesenheit von Doxycyclin. Unterschiedliche Stärken der Transgenexpression beruhen z.T. auf Unterschieden in der Transduktionseffizienz. Mit Ausnahme der U266 Myelomzelllinie war die 3r-vermittelte Genexpression deutlich höher als die CMV-vermittelte Expression.

Figur 13. Inkubation von Ad.3r-luc infizierten HT29 Dickdarmkarzinomzellen mit menschlichen Seren anstatt zertifiziertem Tetracyclin-freiem fötalem Rinderserum. Es gab keine signifikanten Unterschiede bei der Verwendung von menschlichem Serum von Probanden mit einer standardisierten westlichen Ernährung im Vergleich mit zertifiziertem Tetracyclin-freiem fötalem Kälberserum. Diese Daten legen eine Tetracyclin-Konzentration bei den menschlichen Probanden von unter 50 pg/ml nahe. Die Ergänzung der menschlichen Sera mit Doxycyclin (2 μ g/ml) resultiert in einer Unterdrückung der Transgen-Expression wie vorgehend gezeigt. FCS, fötales Kälberserum.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
<120> Rekombinante virale Vektoren zur Tetracyclin-regulierbaren Genexpression
<130> P 60239
<160> 5
<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 11569
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Adenovirales Expressionsplasmid pAd.3r.hscIL-12 zur regulierten Expression des humanen IL-12

<220>
<221> gene
<222> (327)..(713)
<223> VP16

<220>
<221> gene
<222> (714)..(1352)
<223> TetR

<220>
<221> Intron
<222> (1353)..(1912)
<223>

<220>
<221> promoter
<222> (1864)..(1902)
<223> TK-min

<220>
<221> protein_bind
<222> (1913)..(2212)
<223> TetO7

<220>
<221> misc_feature
<222> (2213)..(2709)
<223> CMV-min + Intron

<220>
<221> promoter
<222> (2226)..(2264)
<223> CMV-min

<220>
 <221> gene
 <222> (2710)..(4308)
 <223> Humanes single-chain IL-12

<220>
 <221> mutation
 <222> (4020)..(4023)
 <223> T/C, A/T, G/C, T/G

<400> 1

ctgctggttc	tttccgcctc	agaagccata	gagcccaccg	catccccagc	atgcctgcta	60
ttgtcttccc	aatcctcccc	cttgtctgtc	tgccccaccc	cacccccag	aatagaatga	120
cacctactca	gacaatgcga	tgcaatttcc	tcatTTTTatt	aggaaaggac	agtgggagtg	180
gcaccttcca	gggtcaagga	aggcacgggg	gaggggcaaa	caacagatgg	ctggcaacta	240
gaaggcacag	tcgaggctga	tcagcgagct	ctagcattta	ggtgacacta	tagaataggg	300
ccctctagga	tcgatcctcg	cgccccctac	ccaccgtact	cgtcaattcc	aagggcatcg	360
gtaaacaatct	gctcaaaactc	gaagtcggcc	atatccagag	cgccgtaggg	ggcggagtcg	420
tggggggttaa	atccccggacc	cggggaatcc	ccgtccccca	acatgtccag	atcgaaatcg	480
tctagcgct	cgcatgcgc	catcgccacg	tcctcgccgt	ctaagtggag	ctcgtcccc	540
aggctgacat	cggtcggggg	ggccgtggac	agtctgcgcg	tgtgtcccg	ggggagaaa	600
gacaggcgcg	gagccgccag	ccccgcctct	tcggggcgct	cgtcgtccgg	gagatcgagc	660
aggccctcga	tggtagaccc	gtaattgttt	ttcgtacgcg	cgcggctgta	cgcggaacca	720
ctttcacatt	taagttgttt	ttctaattccg	catatgatca	attcaaggcc	gaataagaag	780
gctggctctg	caccttggtg	atcaaataat	tcgatagctt	gtcgtataaa	tggcggcata	840
ctatcagtag	taggtgtttc	cctttcttct	ttagcgactt	gatgtctctt	atcttccaat	900
acgcaacctg	aagtaaaatg	ccccacagcg	ctgagtgcat	ataatgcatt	ctctagtga	960
aaaccttggt	ggcataaaaa	ggctaattga	ttttcgagag	tttcatactg	tttttctgta	1020
ggcgtgtac	ctaaatgtac	ttttgctcca	tcgcgatgac	ttagtaaaagc	acatctaaaa	1080
cttttagcgt	tattacgtaa	aaaatcttgc	cagctttccc	cttctaaagg	gcaaaagtga	1140
gtatggtgcc	tatctaaccat	ctcaatggct	aaggcgtcga	gcaaagcccg	cttatttttt	1200
acatgccaat	acaatgtagg	ctgctctaca	cctagcttct	gggcgagttt	acgggttggt	1260
aaaccttcga	ttccgacctc	attaagcagc	tctaattgcg	tgtaatacac	tttactttta	1320
tctaattctag	agggctctggg	tctctttggc	atggtcgaat	taattcgcgt	cgagccggcc	1380
gcgggtacaa	ttccggttgg	acctgggagt	ggacacctgt	ggagagaaa	gcaaagtggg	1440
tgtcattgtc	actcaagtgt	atggccagat	ctcaagcctg	ccacacctca	agcttgacaa	1500
caaaaagatt	gtcttttctg	accagatgga	cgcggccacc	ctcaaaggca	tcaccgcggg	1560
ccagggtgaat	atcaaatcct	cctcgttttt	ggaaactgac	aatcttagcg	cagaagtcac	1620
gcccgtttt	gagagggagt	actcaccoca	acagtcgaga	ggttttccga	tcgggtcgat	1680
gcggactcgc	tcaggtccct	cggtggcgga	gtaccgttcg	gaggccgacg	ggtttccgat	1740
ccaagagtac	tggaaagacc	gcgaagagtt	tgtcctcaac	cgcgagccca	acaggcgctc	1800
aagcttgatg	ggtcgctcgg	tgttcgaggg	cacacgcgtc	accttaatat	gcgaagtggg	1860
cctcggaccg	cgcgcgcccg	actgcatctg	cgtgttcgaa	ttgcccggcg	agctcgactt	1920
tcacttttct	ctatcactga	tagggagtg	taaactcgac	tttactttt	ctctatcact	1980
gataggagtg	ggtaaactcg	actttcactt	ttctctatca	ctgataggga	gtggtaaact	2040
cgactttcac	ttttctctat	cactgatagg	gagtggtaaa	ctcgactttc	acttttctct	2100
atcactgata	gggagtggta	aactcgactt	tcacttttct	ctatcactga	tagggagtg	2160
taaactcgac	tttactttt	ctctatcact	gataggagtg	ggtaaaactc	acggtcgagg	2220
gtcgagtagg	cgtgtacggg	gggaggccta	tataagcaga	gctcgtttag	tgaaccgtca	2280
gatcgcctgg	agacgccatc	cacgctgttt	tgacctccat	agaagacacc	gggaccgatc	2340
cagcctccgc	ggccccgaat	tgcaagctt	tattgoggta	gtttatcaca	gttaaattgc	2400
taacgcagtc	agtgccttctg	acacaacagt	ctcgaactta	agctgcagaa	gttggtcgtg	2460
aggcactggg	caggtaagta	tcaaggttac	aagacagggt	taaggagacc	aatagaaact	2520
gggcttgctg	agacagagaa	gactcttgcg	tttctgatag	gcacctattg	gtcttactga	2580
catccacttt	gccttttctt	ccacagggtg	ccactcccag	ttcaattaca	gctcttaagg	2640
ctagagtact	taatacgact	cactataggg	tagcctcgag	aattcacgcg	tggtagccgag	2700
ctcggatcca	tgggtcacca	gcagttgggt	atctcttggt	tttccctggg	ttttctggca	2760
tctccctctg	tggccatatg	ggaactgaag	aaagatgttt	atgtcgtaga	attggattgg	2820
tatccggatg	cccctggaga	aatggtgggt	ctcacctgtg	acacccctga	agaagatggg	2880
atcacctgga	ccttggaacca	gagcagtgag	gtcttaggct	ctggcaaaac	cctgaccatc	2940
caagtcaaag	agtttggaaga	tgctggccag	tacacctgtc	acaaaggagg	cgaggttcta	3000

agccattcgc	tccctgctgct	tcacaaaaag	gaagatggaa	tttgggtccac	tgatattttta	3060
aaggaccaga	aagaacccaa	aaataagacc	tttctaagat	gcgaggccaa	gaattatttct	3120
ggacgtttca	cctgctggtg	gctgacgaca	atcagtactg	atttgacatt	cagtgtcaaa	3180
agcagcagag	gctcttctga	cccccaaggg	gtgacgtgcg	gagctgctac	actctctgca	3240
gagagagtca	gaggggacaa	caaggagtat	gagtactcag	tggagtgcc	ggaggacagt	3300
gcctgcccag	ctgctgagga	gagtcctgcc	attgaggtca	tgggtggatgc	cgttcacaag	3360
ctcaagtatg	aaaactacac	cagcagcttc	ttcatcaggg	acatcatcaa	acctgaccga	3420
cccaagaact	tgacgtgaa	gccattaaag	aattctcggc	aggtggaggt	cagctgggag	3480
taccctgaca	cctggagtac	tccacattcc	tacttctccc	tgacattctg	cgttcaggtc	3540
cagggcaaga	gcaagagaga	aaagaaagat	agagtcttca	cggacaagac	ctcagccacg	3600
gtcatctgcc	gcaaaaatgc	cagcattagc	gtgcggggccc	aggaccgcta	ctatagctca	3660
tcttgagagc	aatgggcatc	tgtgccctgc	agtgggtggc	gtggcgggcg	atctagaaac	3720
ctccccgtgg	ccactccaga	cccaggaatg	ttcccatgcc	ttcaccactc	ccaaaacctg	3780
ctgagggccg	tcagcaacat	gctccagaag	gccagacaaa	ctctagaatt	ttacccttgc	3840
acttctgaag	agattgatca	tgaagatatc	acaaaagata	aaaccagcac	agtggaggcc	3900
tgtttaccat	tggaaattaac	caagaatgag	agttgcctaa	attccagaga	gacctctttc	3960
ataactaatg	ggagttgcct	ggcctccaga	aagacctctt	ttatgatggc	cctgtgcctc	4020
tcgagtattt	atgaagactc	gaagatgtac	caggtggagt	tcaagaccat	gaatgcaaa	4080
cttctgatgg	atcctaagag	gcagatcttt	ctagatcaaa	acatgctggc	agttattgat	4140
gagctgatgc	aggccctgaa	tttcaacagt	gagactgtgc	cacaaaaaatc	ctcccttgaa	4200
gaaccggatt	tttataaaac	taaaatcaag	ctctgcatac	ttcttcatgc	tttcagaatt	4260
cgggcagtg	ctattgatag	agtgatgagc	tatctgaatg	cttcctaaaa	agcgaggctc	4320
atccggatta	gtccaatttg	ttaaagacag	gatatcagtg	gtccaggctc	tagttttgac	4380
tcaacaatat	caccagctga	agcctataga	gtacgagcca	tagataaaat	aaaagatttt	4440
athtagtctc	cagaaaaagg	ggggaatgaa	agaccccacc	tgtagggtttg	gcaagctagt	4500
aacggccgccc	agtgtgctgg	aattctgcag	atatccatca	cactggcggc	cgctcgagca	4560
tgcatctaga	gggcccctatt	ctatagtgtc	acctaaatgc	tagagctcgc	tgatcagcct	4620
cgactgtgcc	ttctagtgtc	cagccatctg	ttgtttgccc	ctcccccggtg	ccttccttga	4680
ccctggaagg	tgccactccc	actgtccttt	cttaataaaa	tgaggaaatt	gcactgcatt	4740
gtctgagtag	gtgtcattct	attctggggg	gtgggggtggg	gcaggacagc	aagggggagg	4800
attgggaaga	caatagcagg	catgctgggg	atgcgggtggg	ctctatggct	tctgaggcgg	4860
aaagaaccag	tcgacatcga	tgctagagtg	gaaggtgctg	aggtacgatg	agacccgcac	4920
caggtgcaga	ccctgcgagt	gtggcggtaa	acatattagg	aaccagcctg	tgatgctgga	4980
tgtgaccgag	gagctgaggg	cogatcactt	ggtgctggcc	tgaccccgcg	ctgagtttgg	5040
ctctagcgat	gaagatacag	attgaggtac	tgaaatgtgt	gggcgtggct	taaggggtggg	5100
aaagaatata	taaggtgggg	gtcttatgta	gtttttgtatc	tgttttgcag	cagccgccc	5160
cgccatgagc	accaactcgt	ttgatggaag	cattgtgagc	tcataatttga	caacgcgcac	5220
gcccccatgg	gcccgggtgc	gtcagaatgt	gatgggctcc	agcattgatg	gtcggcccgt	5280
cctgcccgcga	aactctacta	ccttgacctg	cgagaccgtg	tctggaacgc	cgcttgagac	5340
tgacgcctcc	gccgcccgtt	cagccgctgc	agccaccgcc	cgccgggattg	tgactgactt	5400
tgctttcctg	agcccgttgc	caagcagtg	agcttcccgt	tcacccgccc	gcgatgacaa	5460
gttgacggct	cttttgccac	aattggattc	tttgaccg	gaacttaatg	tcgtttctca	5520
gcagctgttg	gatctgcgcc	agcaggtttc	tgccctgaag	gcttcctccc	ctcccaatgc	5580
ggtttaaaac	ataaataaaa	aaccagactc	tgtttggtatt	tggatcaagc	aagtgtcttg	5640
ctgtctttat	ttaggggttt	tgcgcgcgcg	gtaggcccgg	gaccagcggg	ctcggctcgt	5700
gagggctcctg	tgtatttttt	ccaggacgtg	gtaaagggtga	ctctggatgt	tcagatacat	5760
gggcataaagc	ccgtctctgg	ggtggaggta	gcaccactgc	agagcttcat	gctgcggggg	5820
ggtgtttag	atgatccagt	cgtagcagga	gcgctggg	tggtgcctaa	aatgtcttt	5880
cagtagcaag	ctgattgcca	ggggcaggcc	cttggtgtaa	gtgtttacaa	agcggttaag	5940
ctgggatggg	tgcatagctg	gggatatgag	atgcatcttg	gactgtattt	ttaggttggc	6000
tatgttccca	gccatatccc	tccggggatt	catgttgtgc	agaaccacca	gcacagtgt	6060
tccggtgcac	ttgggaaatt	tgtcatgtag	cttagaagga	aatgcgtgga	agaacttgg	6120
gacgcccttg	tgacctccaa	gattttccat	gcattcgtcc	ataatgatgg	caatgggccc	6180
acggggcg	gcctgggcga	agatatttct	gggatcacta	acgtcatagt	tgtgttccag	6240
gatgagatcg	tcataggcca	tttttacaaa	gcgcgggcg	aggggtgccag	actgcgggt	6300
aatggttcca	tccggcccag	gggcgtagtt	accctcacag	atttgcat	cccacgctt	6360
gagttcagat	ggggggatca	tgtctacctg	cggggcgatg	aagaaaacgg	tttccgggg	6420
aggggagatc	agctgggaag	aaagcaggtt	cctgagcagc	tgcgacttac	cgacggcgg	6480
gggcccgtaa	atcacaccta	ttaccgggtg	caactggtag	ttaagagagc	tgacgtgcc	6540
gtcatccctg	agcagggggg	ccacttcgtt	aagcatgtcc	ctgactcgca	tgttttccct	6600
gaccaaattcc	gccagaaggc	gctcgccgcc	cagcgatagc	agttcttgca	aggaagcaaa	6660

gtttttcaac	ggtttgagac	cgtccgcgct	aggcatgctt	ttgagcggtt	gaccaagcag	6720
ttccaggcgg	ttccacagct	cggtcacctg	ctctacggca	tctcgatcca	gcatactctc	6780
tcgttttcg	ggttggggcg	gcttttcgctg	tacggcagta	gtcgggtgctc	gtccagacgg	6840
gccaggggtca	tgtctttcca	cgggcgcagg	gtcctcgta	gcgtagtctg	ggtcacgggtg	6900
aaggggtg	ctccgggctg	cgcgctggcc	aggggtgcgt	tgaggctggt	cctgctgggtg	6960
ctgaagcgct	gccggtcttc	gcctgcgcg	tcggccagg	agcatttgac	catgggtgtca	7020
tagtccagcc	cctccgcggc	gtggcccttg	gcgcgcagct	tgcccttgga	ggaggcgccg	7080
cacgaggggc	agtgcagact	tttgagggcg	tagagcttgg	gcgcgagaaa	taccgattcc	7140
ggggagtagg	catccgcgcc	gcaggcccg	cagacggtct	cgcattccac	gagccagggtg	7200
agctctggcc	gttcggggtc	aaaaaccagg	tttcccccat	gctttttgat	gcgtttctta	7260
cctctgggtt	ccatgagccg	gtgtccacgc	tcgggtgacga	aaaggctgtc	cgtgtccccg	7320
tatacagact	tgagaggcct	gtcctcgacc	gatgcccttg	agagccttca	accagtcag	7380
ctccttccgg	tgggcgcggg	gcattgactat	cgtcgcgcga	cttatgactg	tcttctttat	7440
catgcaactc	gtaggacagg	tgccggcagc	gctctgggtc	atttttcggcg	aggaccgctt	7500
tcgctggagc	gcgacgatga	tcggcctgtc	gcttgcggtg	ttcgggaatct	tgacgcctc	7560
cgtcaagcc	ttcgtcactg	gtcccgcac	caaagcttct	ggcgagaagc	aggccattat	7620
cgcggcgatg	gcggccgacg	cgtgggcta	cgtcttgctg	gcgttcgcga	cgcgaggctg	7680
gatggccttc	cccattatga	ttcttctcgc	ttccggcggc	atcggtatgc	ccgcgttgca	7740
ggccatgctg	tccaggcagg	tagatgacga	ccatcaggga	cagcttcaag	gatcgctcgc	7800
ggctcttacc	agcctaactt	cgatcactgg	accgctgatt	gtcacggcga	tttatgccgc	7860
ctcggcgagc	acatggaacg	ggttggcatg	gattgtaggc	gccgccctat	accttgtctg	7920
cctccccgcg	ttgcgtcgcg	gtgcatggag	cggggccacc	tcgacctgaa	tggaaagccgg	7980
cggcacctcg	ctaacggatt	caccactcca	agaattggag	ccaatcaatt	cttgcggaga	8040
actgtgaatg	cgaaaccaca	cccttggcag	aacatattcca	tcgcgtccgc	catctccagc	8100
agccgcacgc	ggcgcatctc	gggcagcggt	gggtcctggc	cacgggtg	catgatcggtg	8160
ctcctgtcgt	tgaggaccgg	gctaggctgg	cggggttgcc	ttactggtta	gcagaatgaa	8220
tcaccgatac	gcgagcgaac	gtgaagcgac	tgctgctgca	aaacgtctgc	gacctgagca	8280
acaacatgaa	tggcttccg	tttccgtggt	tcgtaaagtc	tggaaacgcg	gaagtcagcg	8340
ccctgcacca	ttatgttccg	gatctgcac	gcaggatgct	gctggctacc	ctgtggaaca	8400
cctacatctg	tattaacgaa	gcgctggcat	tgacctgag	tgatttttct	ctggtcccgc	8460
cgcattccata	ccgccagttg	tttaccctca	caacgttcca	gtaaccgggc	atgttcatca	8520
tcagtaaccc	gtatcgtgag	catcctctct	cgtttcatcg	gtatcattac	ccccatgaac	8580
agaaattccc	ccttacacgg	aggcatcaag	tgaccaaaca	ggaaaaaacc	gcccttaaca	8640
tggcccgctt	tatcagaagc	cagacattaa	cgttcttgga	gaaactcaac	gagctggacg	8700
cggatgaaca	ggcagacatc	tgtgaatcgc	ttcacgacca	cgtgatgag	ctttaccgca	8760
gctgcctcgc	gcgtttcggt	gatgacgggtg	aaaacctctg	acacatgcag	ctcccggaga	8820
cggtcacagc	ttgtctgtaa	gcggatgccg	ggagcagaca	agcccgtcag	ggcgcgtcag	8880
cgggtgtgtg	cgggtgtcgg	ggcgacgcca	tgaccagtc	acgtagcgat	agcggagtgt	8940
atactggctt	aactatgcgg	catcagagca	gattgtactg	agagtgcacc	atatgcgggtg	9000
tgaataaccg	cacagatgcg	taaggagaaa	ataccgcac	aggcgtctct	ccgcttcttc	9060
gctcactgac	tcgctgcgct	cggctgcttcg	gctgcggcga	gcggtatcag	ctcactcaaa	9120
ggcggttaata	cggttatcca	cagaatcagg	ggataacgca	ggaaagaaca	tgtgagcaaa	9180
aggccagcaa	aaggccagga	accgtaaaaa	ggccgcgttg	ctggcggttt	tccataggct	9240
ccgccccct	gacgagcatc	acaaaaatcg	acgctcaagt	cagagggtggc	gaaacccgac	9300
aggactataa	agataccagg	cgtttcccc	tggaaagctc	ctcgtgcgt	ctcctgttcc	9360
gacctgccc	cttaccggat	acctgtccgc	ctttctccct	tcgggaagcg	tggcgctttc	9420
tcaatgctca	cgtgtagggt	atctcagttc	ggtgtaggtc	gttcgctcca	agctgggctg	9480
tgtgcacgaa	cccccgcttc	agcccgaacc	ctgcgcctta	tccggttaact	atcgtcttga	9540
gtccaaccgg	gtaagacacg	acttatcgcc	actggcagca	gccactggta	acaggattag	9600
cagagcgagg	tatgtaggcg	gtgctacaga	gttcttgaag	tgggtggccta	actacggcta	9660
cactagaagg	acagtatttg	gtatctgcgc	tctgctgaag	ccagttacct	tcggaaaaag	9720
agttggtagc	tcttgatccg	gcaaacaaac	caccgctgggt	agcgggtggtt	ttttgtttg	9780
caagcagcag	attacgcgca	gaaaaaaagg	atctcaagaa	gatcctttga	tcttttctac	9840
ggggtctgac	gctcagtggg	acgaaaactc	acgttaagggt	atttttggtca	tgagattatc	9900
aaaaaggatc	ttcacctaga	tcctttttaa	ttaaaaatga	agtttttaaat	caatctaaag	9960
tatatatgag	taaacttgggt	ctgacagtta	ccaatgctta	atcagtggag	cacctatctc	10020
agcgatctgt	ctatttcggt	catccatagt	tcctgactc	cccgtcgtgt	agataactac	10080
gatacgggag	ggcttaccat	ctggccccag	tgctgcaatg	ataccgcgag	accacgctc	10140
accggctcca	gatttatcag	caataaacca	gccagccgga	agggccgagc	gcagaagtgg	10200
tcctgcaact	ttatccgcct	ccatccagtc	tattaattgt	tgccgggaag	ctagagtaag	10260
tagttcgcca	gttaatagtt	tgcgcaacgt	tgttgccatt	gctgcaggca	tcgtgggtgtc	10320

```

acgctcgtcg tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac 10380
atgatccccc atggttggtgca aaaaagcggg tagctccttc ggtcctccga tcggtgtcag 10440
aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat ggttatggca gcaactgcata attctcttac 10500
tgtcatgccca tccgtaagat gcttttctgt gactggtgag tactcaacca agtcattctg 10560
agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc ttgcccggcg tcaacacggg ataataccgc 10620
gccacatagc agaactttta aagtgtctcat cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact 10680
ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa cccactcgtg caccacaactg 10740
atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa 10800
tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatac tcttcctttt 10860
tcaatattat tgaagcattt atcaggggta ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg 10920
tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga 10980
cgtctaagaa accattatta tcatgacatt aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc 11040
ctttcgtctt caagaattct tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg tatcacgagg 11100
ccctttcgtc atcatcaata atatacctta ttttggtattg aagccaatat gataatgagg 11160
gggtggagtt tgtgacgtgg cgcgggcggt gggaacgggg cggtgacgt agtagtgtgg 11220
cggaagtgtg atgttgcaag tgtggcgga ccatgtgaag cgccggatgt ggtaaaagtg 11280
acgttttttg tgtgcgccgg tgtatacggg aagtgacaat tttcgcgcg ttttaggcgg 11340
atgttgtagt aaatttgggc gtaaccaagt aatgtttggc cattttcgcg ggaaaactga 11400
ataagaggaa gtgaaatctg aataattctg tgttactcat agcgcgtaat atttgtctag 11460
ggccgcgggg actttgaccg tttacgtgga gactcgccca ggtgtttttc tcaggtgttt 11520
tccgcgttcc gggtaaagt tggcgtttta ttattatagt cagctctag 11569

```

<210> 2

<211> 11458

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Adenovirales Expressionsplasmid pAd.3r.mscIL-12 zur regulierten Expression des murinen IL-12

<220>

<221> gene

<222> (327)..(713)

<223> VP16

<220>

<221> gene

<222> (714)..(1352)

<223> TetR

<220>

<221> Intron

<222> (1353)..(1912)

<223>

<220>

<221> promoter

<222> (1864)..(1902)

<223> TK-min

<220>

<221> protein_bind

<222> (1913)..(2212)

<223> TetO7

<220>

<221> misc_feature

<222> (2213) .. (2687)
 <223> CMV-min + Intron

<220>
 <221> promoter
 <222> (2226) .. (2264)
 <223> CMV-min

<220>
 <221> gene
 <222> (2688) .. (4325)
 <223> Murines single-chain IL-12

<400> 2

ctgctgggttc	tttccgcctc	agaagccata	gagcccaccg	catccccagc	atgcctgcta	60
ttgtcttccc	aatcctcccc	cttgctgtcc	tgccccaccc	cacccccccag	aatagaatga	120
cacctactca	gacaatgcga	tgcaatttcc	tcatttttatt	aggaaaggac	agtgggagtg	180
gcaccttcca	gggtcaagga	aggcacgggg	gaggggcaaa	caacagatgg	ctggcaacta	240
gaaggcacag	tcgaggctga	tcagcgagct	ctagcattta	ggtgacacta	tagaataggg	300
ccctctagga	tcgatcctcg	cgccccctac	ccaccgtact	cgtcaattcc	aagggcatcg	360
gtaaacatct	gctcaaaactc	gaagtcggcc	atatccagag	cgccgtaggg	ggcggagtgc	420
tggggggtaa	atccccggacc	cggggaatcc	ccgtccccca	acatgtccag	atcgaaatcg	480
tctagcgcgt	cggcatgcgc	catcgccacg	tcctcgccgt	ctaagtggag	ctcgtccccc	540
aggctgacat	cggtcggggg	ggccgtggac	agtctgcgcg	tgtgtcccg	ggggagaaag	600
gacaggcgcg	gagccgccag	ccccgcctct	tcggggggcg	cgtcgtccgg	gagatcgagc	660
aggccctcga	tggtagaccc	gtaattgttt	ttcgtacgcg	cgcggtctga	cgcggaacca	720
ctttcacatt	taagttgttt	ttctaattcc	catatgatca	attcaaggcc	gaataagaag	780
gctggctctg	caccttggtg	atcaaataat	tcgatagctt	gtcgtataaa	tggcggcata	840
ctatcagtag	taggtgtttc	cctttcttct	ttagcgactt	gatgctcttg	atcttccaat	900
acgcaacctg	aagtaaaaatg	ccccacagcg	ctgagtgcat	ataatgcatt	ctctagtga	960
aaaccttggt	ggcataaaaa	ggctaattga	ttttcgagag	tttcatactg	tttttctgta	1020
ggcgtgtac	ctaaatgtac	ttttgctcca	tcgcatgac	ttagtaaaagc	acatctaaaa	1080
cttttagcgt	tattacgtaa	aaaatcttgc	cagctttccc	cttctaagg	gcaaaagtga	1140
gtatggtgcc	tatctaaca	ctcaatggct	aaggcgtcga	gcaaagcccg	cttatttttt	1200
acatgccaat	acaatgtagg	ctgctctaca	cctagcttct	gggagagttt	acgggttggt	1260
aaaccttcga	ttccgacctc	attaagcagc	tctaattgcg	tgtaaatcac	tttactttta	1320
tctaattctag	agggtctggg	tctctttggc	atggctgaat	taattcgcgt	cgagccggcc	1380
gcgggtacaa	ttccggttgg	acctgggagt	ggcacctgt	ggagagaaag	gcaaagtgga	1440
tgtcattgtc	actcaagtgt	atggccagat	gtcaagcctg	ccacacctca	agcttgacaa	1500
caaaaagatt	gtcttttctg	accagatgga	cgcggccacc	ctcaaaggca	tcaccgcggg	1560
ccaggtgaat	atcaaactct	cctcgttttt	ggaaactgac	aatcttagcg	cagaagtcac	1620
gcccgttttt	gagagggagt	actcacccca	acagtcgaga	ggttttccga	tccggctcat	1680
gcggactcgc	tcaggtccct	cgggtggcga	gtaccgttcg	gaggccgacg	ggtttccgat	1740
ccaagagtac	tggaaagacc	gcgaagagtt	tgtcctcaac	cgcgagccca	acaggcgtcg	1800
aagcttgatg	ggtcgctcgg	tggtcgaggc	cacacgcgtc	accttaatat	gcgaagtgga	1860
cctcggaccg	cgccgccccg	actgcatctg	cgtgttcgaa	ttgcccggcg	agctcgactt	1920
tcacttttct	ctatcactga	tagggagtgg	taaactcgac	tttcaacttt	ctctatcact	1980
gatagggagt	ggtaaaactcg	actttcactt	ttctctatca	ctgataggga	gtggtaaaact	2040
cgactttcac	ttttctctat	cactgatagg	gagtggtaaa	ctcgactttc	acttttctct	2100
atcactgata	gggagtggta	aactcgactt	tcacttttct	ctatcactga	tagggagtgg	2160
taaactcgac	tttcaacttt	ctctatcact	gatagggagt	ggtaaaactcg	acggtcgagg	2220
gtcgagttagg	cgtgtacggg	gggaggccta	tataagcaga	gctcgttttag	tgaaccgtca	2280
gatcgcttgg	agacgccatc	cacgctgttt	tgacctccat	agaagacacc	gggaccgatc	2340
cagcctccgc	ggccccgaat	tgcgaagcct	tattgcggta	gtttatcaca	gttaaattgc	2400
taacgcagtc	agtgttctcg	acacaacagt	ctcgaactta	agctgcagaa	gttggctcgtg	2460
aggcactggg	caggtaagta	tcaaggttac	aagacaggtt	taaggagacc	aatagaaact	2520
gggcttgtcg	agacagagaa	gactcttgcg	tttctgatag	gcacctattg	gtcttactga	2580
catccacttt	gcctttctct	ccacaggtgt	ccactcccag	ttcaattaca	gctcttaagg	2640
ctagagtact	taatacgact	cactatagtc	tagcctcgag	aattcgaatg	gccatgggtc	2700
ctcagaagct	aaccatctcc	tggtttgcca	tcgttttgct	ggtgtctcca	ctcatggcca	2760
tgtgggagct	ggagaaagac	gtttatgttg	tagaggtgga	ctggactccc	gatgcccctg	2820

gagaaacagt	gaacctcacc	tgtgacacgc	ctgaagaaga	tgacatcacc	tggacctcag	2880
accagagaca	tggagtcata	ggctctggaa	agaccctgac	catcactgtc	aaagagtttc	2940
tagatgctgg	ccagtacacc	tgccacaaag	gaggcgagac	tctgagccac	tcacatctgc	3000
tgctccacaa	gaaggaaaat	ggaatttggg	ccactgaaat	tttaaaaaat	ttcaaaaaca	3060
agactttcct	gaagtgtgaa	gcaccaaatt	actccggacg	gttcacgtgc	tcatggctgg	3120
tgcaaagaaa	catggacttg	aagttcaaca	tcaagagcag	tagcagttcc	cctgactctc	3180
gggcagtgc	atgtggaatg	gcgtctctgt	ctgcagagaa	ggtcacactg	gaccaaaggg	3240
actatgagaa	gtattcagtg	tcctgccagg	aggatgtcac	ctgcccact	gccgaggaga	3300
ccctgcccac	tgaactggcg	ttggaagcac	ggcagcagaa	taaatatgag	aactacagca	3360
ccagcttctt	catcaggggac	atcatcaaac	cagacccgcc	caagaacttg	cagatgaagc	3420
ctttgaagaa	ctcacagggtg	gaggtcagct	gggagtaccc	tgactcctgg	agcactcccc	3480
attcctactt	ctccctcaag	ttctttgttc	gaatccagcg	caagaaagaa	aagatgaagg	3540
agacagagga	ggggtgtaac	cagaaagggtg	cgttcctcgt	agagaagaca	tctaccgaag	3600
tccaatgcaa	aggcggaat	gtctgcgtgc	aagctcagga	tcgctattac	aattcctcat	3660
gcagcaagtg	ggcatgtgtt	ccctgcaggg	tccgatccgg	tggcgggtggc	tcgggcgggtg	3720
gtgggtcggg	tggcggcgga	tctagggtca	ttccagtctc	tggacctgcc	aggtgtctta	3780
gccagtcccg	aaacctgctg	aagaccacag	atgacatggt	gaagacggcc	agagaaaaac	3840
tgaaacatta	ttcctgcact	gctgaagaca	tcgatcatga	agacatcaca	cgggaccaa	3900
ccagcacatt	gaagacctgt	ttaccactgg	aactacacaa	gaacgagagt	tgcttggtta	3960
ctagagagac	ttcttccaca	acaagaggga	gctgcctgcc	cccacagaag	acgtctttga	4020
tgatgaccct	gtgccttggg	agcatctatg	aggacttgaa	gatgtaccag	acagagttcc	4080
aggccatcaa	cgcagcactt	cagaatcaca	accatcagca	gatcattcta	gacaagggca	4140
tgctgggtggc	catcgatgag	ctgatgcagt	ctctgaatca	taatggcgag	actctgcgcc	4200
agaaacctcc	tgtgggagaa	gcagacctt	acagagtga	aatgaagctc	tgcatcctgc	4260
ttcacgcctt	cagcaccgcg	gtcgtgacca	tcaacagggt	gatgggctat	ctgagctccg	4320
cctgagaatt	gatccggatt	agtccaattt	gttaaagaca	ggatggggccc	tatatatgga	4380
tccactagta	acggccgcca	gtgtgctgga	attctgcaga	tatccatcac	actggcgggc	4440
gctcgagcat	gcatctagag	ggccctattc	tatagtgtca	cctaaatgct	agagctcgct	4500
gatcagcctc	gactgtgcct	tctagttgcc	agccatctgt	tgtttgcccc	tccccgtgc	4560
cttccttgac	cctggaaggt	gccactccca	ctgtcctttc	ctaataaaat	gaggaaattg	4620
catcgcattg	tctgagtagg	tgtcattcta	ttctgggggg	tgggggtgggg	caggacagca	4680
agggggagga	ttgggaagac	aatagcaggc	atgctgggga	tgcgggtgggc	tctatggctt	4740
ctgaggcgga	agaaccagt	cgacatcgat	gctagagtgg	aagggtgctga	ggtacgatga	4800
gacccgcacc	aggtgcagac	cctgcgagtg	tggcggtaaa	catattagga	accagcctgt	4860
gatgctggat	gtgaccgagg	agctgaggcc	cgatcacttg	gtgctggcct	gcacccgcgc	4920
tgagtttggc	tctagcgatg	aagatacaga	ttgagggtact	gaaatgtgtg	ggcgtggctt	4980
aagggtggga	aagaatatat	aagggtgggg	tcttatgtag	ttttgtatct	gttttgcagc	5040
agccgcgcgc	gccatgagca	ccaactcggt	tgatggaagc	attgtgagct	catatttgac	5100
aacgcgcag	cccccatggg	ccgggggtgcg	tcagaatgtg	atgggctcca	gcattgatgg	5160
tcgccccgtc	ctgcccgcga	actctactac	cttgacctac	gagaccgtgt	ctggaacgcc	5220
gttggagact	gcagcctccg	ccgcgccttc	agccgctgca	gccaccgccc	gcgggattgt	5280
gactgacttt	gctttcctga	gcccgccttg	aagcagtgca	gcttcccgtt	catccgcccc	5340
cgatgacaag	ttgacggctc	ttttggcaca	attggattct	ttgaccggg	aacttaatgt	5400
cgttttctcag	cagctgttgg	atctgcgcga	gcaggtttct	gcccgtgaag	cttccctccc	5460
tcccaatgcg	gttttaaaaca	taaataaaaa	accagactct	gttttgattt	ggatcaagca	5520
agtgtcttgc	tgtctttatt	taggggtttt	gcgcgcgcgg	tagggccggg	accagcggtc	5580
tcggctcgtg	agggtcctgt	gtattttttc	caggacgtgg	taaaggtag	tctggatggt	5640
cagatacatg	ggcataagcc	cgtctctggg	gtggaggtag	caccactgca	gagcttcatg	5700
ctgcgggggtg	gtgttgtaga	tgatccagtc	gtagcaggag	cgctgggcgt	ggtgcctaaa	5760
aatgtctttc	agtagcaagc	tgattgccag	gggcaggccc	ttggtgtaag	tgtttacaaa	5820
gcggttaagc	tgggatgggt	gcatacgtgg	ggatatgaga	tgcatcttgg	actgtatttt	5880
taggttggct	atgttcccag	ccatatccct	ccggggattc	atgttgtgca	gaaccaccag	5940
cacagtgtat	ccggtgcact	tgggaaattt	gtcatgtagc	ttagaaggaa	atgcgtggaa	6000
gaacttggag	acgcccttgt	gacctccaag	attttccatg	cattcgtcca	taatgatggc	6060
aatgggcccc	cgggcggcgg	cctggggcga	gatatttctg	ggatcactaa	cgatcatagt	6120
gtgttccagg	atgagatcgt	cataggccat	ttttacaaag	cgcgggcgga	gggtgccaga	6180
ctgcgggtata	atggttccat	ccggcccagg	ggcgtagtta	ccctcacaga	tttgcatttc	6240
ccacgctttg	agttcagatg	gggggatcat	gtctacctgc	ggggcgatga	agaaaacggt	6300
ttccggggta	ggggagatca	gctgggaaga	aagcagggttc	ctgagcagct	gcgacttacc	6360
gcagccgggtg	ggcccgtaaa	tcacacctat	taccgggtgc	aactggtagt	taagagagct	6420
gcagctgccg	tcatccctga	gcaggggggc	cacttcgtta	agcatgtccc	tgactcgcat	6480

gttttccctg	accaaaccg	ccagaaggcg	ctcgccgccc	agcgatagca	gttcttgcaa	6540
ggaagcaaaag	tttttcaacg	gtttgagacc	gtccgcccgt	ggcatgcttt	tgagcgcttg	6600
accaagcagt	tccaggcggt	cccacagctc	ggtcacctgc	tctacggcat	ctcgatccag	6660
cataatctcct	cgtttcgcgg	gttggggcg	ctttcgctgt	acggcagtag	tcgggtgctcg	6720
tccagacggg	ccagggtcat	gtctttccac	gggcccaggg	tcttcgctcag	cgtagtctgg	6780
gtcacgggtga	aggggtgcgc	tccgggctgc	gcgctggcca	gggtgcgctt	gaggctggtc	6840
ctgctgggtgc	tgaagcgctg	ccggtcttcg	ccctgcgctg	cggccaggta	gcatttgacc	6900
atggtgtcat	agtccagccc	ctccgcggcg	tggcccttgg	cgcgcagctt	gccttggag	6960
gaggcgccgc	acgaggggca	gtgcagactt	ttgaggcggt	agagcttggg	cgcgagaaat	7020
accgattccg	gggagtaggc	atccgcgccc	caggccccgc	agacgggtctc	gcattccacg	7080
agccagggtga	gctctggccg	ttcgggggtca	aaaaccagggt	ttcccccatg	ctttttgatg	7140
cgtttcttac	ctctgggttc	catgagccgg	tgtccacgct	cgggtgacgaa	aaggctgtcc	7200
gtgtccccgt	atacagactt	gagaggcctg	tcctcgaccg	atgcccttga	gagccttcaa	7260
cccagtcagc	tccttccgggt	gggcccgggg	catgactatc	gtcgccgcac	ttatgactgt	7320
cttcttttatc	atgcaactcg	taggacaggt	gccggcagcg	ctctgggtca	ttttcggcga	7380
ggacgcgttt	cgctggagcg	cgacgatgat	cggcctgtcg	cttgcggtat	tcggaatctt	7440
gcacgccctc	gctcaagcct	tcgtcactgg	tcccggccacc	aaacgtttcg	gcgagaagca	7500
ggccattatc	gccggcatgg	cggccgacgc	gcttggtctac	gtcttgctgg	cgttcgcgac	7560
gcgaggctgg	atggccttcc	ccattatgat	tcttctcgct	tccggcgcca	tcgggagcc	7620
cgcgttgtag	gccatgctgt	ccaggcaggt	agatgacgac	catcaggagac	agcttcaagg	7680
atcgctcgcg	gctcttacc	gcctaacttc	gatcactgga	ccgctgatcg	tcacggcgat	7740
ttatgccgcc	tcggcgagca	catggaacgg	gttggcatgg	attgtaggcg	ccgcctata	7800
ccttgtctgc	ctcccccggt	tgcgtcgcg	tgcattggagc	cgggccacct	cgacctgaat	7860
ggaagccggc	ggcacctcgc	taacggattc	accactccaa	gaattggagc	caatcaattc	7920
ttgcggagaa	ctgtgaatgc	gcaaaccaac	ccttggcaga	acatatccat	cgcgtccgcc	7980
atctccagca	gccgcacgcg	gcgcactctc	ggcagcgctg	ggtcctggcc	acgggtgcgc	8040
atgatcgctgc	tcctgtcggt	gaggaccg	ctaggctggc	ggggttgctt	tactggttag	8100
cagaatgaat	caccgatacg	cgagcgaacg	tgaagcgact	gctgctgcaa	aacgtctgcg	8160
acctgagcaa	caacatgaat	ggtcttcgggt	ttccgtgttt	cgtaaagtct	ggaaaacggc	8220
aagtcagcgc	cctgcacccat	tatgttccgg	atctgcactc	caggatgctg	ctggctaccc	8280
tgtggaacac	ctacatctgt	attaacgaag	cgctggcatt	gaccctgagt	gatttttctc	8340
tgggtcccgc	gcattccatac	cgccagttgt	ttaccctcac	aacgttccag	taaccgggca	8400
tggtcatcat	cagtaacccg	tatcgtgagc	atcctctctc	gtttcatcgg	tatcattacc	8460
cccatgaaca	gaaattcccc	cttacacgga	ggcatcaagt	gaccaaaccag	gaaaaaacccg	8520
cccttaacat	ggcccgtttt	atcagaagcc	agacattaac	gcttctggag	aaactcaacg	8580
agctggagcg	ggatgaacag	gcagacatct	gtgaatcgct	tcacgaccac	gctgatgagc	8640
ttatccgcag	ctgcctcgcg	cgtttcgggt	atgacgggtga	aaacctctga	cacatgcagc	8700
tcccggagac	gggtcacagct	tgtctgtaag	cggatggccg	gagcagacaa	gcccgtcagg	8760
gcgcgtcagc	gggtgttggc	gggtgtcggg	gcgcagccat	gaccagtcga	cgtagcgata	8820
gcggagtgt	tactggctta	actatgcggc	atcagagcag	attgtactga	gagtgcacca	8880
tatgcgggtg	gaaataccgc	acagatgcgt	aaggagaaaa	taccgcatca	ggcgtctctc	8940
cgcttccctc	ctcactgact	cgctgcgctc	ggtcgttcgg	ctgcggcgag	cggtatcagc	9000
tactcaaaag	gcggtaatac	ggttatccac	agaatcaggg	gataacgcag	gaaagaacat	9060
gtgagcaaaa	ggccagcaaa	aggccaggaa	ccgtaaaaag	gccgcgttgc	tggcggtttt	9120
ccataggctc	cgcctccctg	acgagcatca	caaaaatcga	cgctcaagtc	agaggtggcg	9180
aaacccgaca	ggactataaa	gataccagcg	gtttccccct	ggaagctccc	tcgtgcgctc	9240
tcctgttccg	accctgccgc	ttaccggata	cctgtccgcc	tttctccctt	cgggaagcgt	9300
ggcgttttct	caatgctcac	gctgtaggta	tctcagttcg	gtgtaggtcg	ttcgctccaa	9360
gctgggctgt	gtgcacgaac	ccccggttca	gcccagaccg	tgcgccttat	ccggtaacta	9420
tcgtcttgag	tccaacccgg	taagacacga	cttatcgcca	ctggcagcag	ccactggtaa	9480
caggattagc	agagcgagggt	atgtagggcg	tgtacagag	ttcttgaagt	ggtggcctaa	9540
ctacggctac	actagaagga	cagtatttgg	tatctgcgct	ctgctgaagc	cagttacctt	9600
cggaaaaaga	gttggttagct	cttgatccgg	caaacaaacc	accgctggta	gcgggtggtt	9660
ttttgtttgc	aagcagcaga	ttacgcgcga	aaaaaaagga	tctcaagaag	atcctttgat	9720
ctttctcagc	gggtctgacg	ctcagtggaa	cgaaaactca	cgtaaaggga	ttttggtcat	9780
gagattatca	aaaaggatct	tcacctagat	cccttttaaat	taaaaatgaa	gtttttaa	9840
aatctaaagt	atatatgagt	aaacttgggt	tgacagttac	caatgcttaa	tcagttaggc	9900
acctatctca	gcgatctgtc	tatttcgttc	atccatagtt	gcctgactcc	ccgtcgtgta	9960
gataactacg	atacgggagg	gcttaccatc	tggcccccag	gctgcaatga	taccgcgaga	10020
cccacgctca	cgggtccag	atctatcagc	aataaaccag	ccagccggaa	ggccgcgagc	10080
cagaagtgggt	cctgcaactt	tatccgcctc	catccagctc	attaattgtt	gccgggaagc	10140

```

tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaacggt gttgccattg ctgcaggcat 10200
cgtgggtgtca cgctcgctcg ttggtatggc ttcatcagc tccgggtccc aacgatcaag 10260
gcgagttaca tgatcccca tgttggtgcaa aaaagcgggt agctccttcg gtcctccgat 10320
cgttggtcaga agtaagttgg ccgcagtggt atcactcatg gttatggcag cactgcataa 10380
ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg actgggtgagt actcaaccaa 10440
gtcattctga gaatagtgtg tgcggcgacc gaggttgctct tgcccggcgt caacacggga 10500
taataccgcg ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg 10560
gcgaaaactc tcaaggatct taccgctggt gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc 10620
acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg 10680
aaggcaaaat gccgcaaaaa aggggaataag ggcgacacgg aaatggtgaa tactcatact 10740
cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat 10800
atgtgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt 10860
gccacctgac gtctaagaaa ccattattat catgacatta acctataaaa ataggcgtat 10920
cacgaggccc tttcgtcttc aagaattctt atcatgacat taacctataa aaataggcgt 10980
atcacgaggc cttttcgtca tcatcaataa tataccttat tttggattga agccaatatg 11040
ataatgaggg ggtggagttt gtgacgtggc gcgggggcgtg ggaacggggc gggtgacgta 11100
gtagtgtggc ggaagtgtga tgttgcaagt gtggcggaac acatgtaagc gccggatgtg 11160
gtaaaagtga cgttttttggg gtgcgccggg gtatacggga agtgacaatt ttcgcgcggt 11220
tttaggcgga tgttgtagta aatttgggcg taaccaagta atgtttggcc attttcgcgg 11280
gaaaaactga taagaggaag tgaaatctga ataattctgt gttactcata gcgcgtaata 11340
tttgtctagg gccgcgggga ctttgaccgt ttacgtggag actcgcccag gtgtttttct 11400
caggtgtttt ccgcgttccg ggtcaaagtt ggcgttttat tattatagtc agctctag 11458

```

<210> 3

<211> 11453

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Adenovirales Expressionsplasmid pShuttle.3r.hscIL-12 zur regulierten Expression des humanen IL-12 nach Virusgeneration mittels AdEasy

<220>

<221> gene

<222> (327)..(713)

<223> VP16

<220>

<221> gene

<222> (714)..(1352)

<223> TetR

<220>

<221> Intron

<222> (1353)..(1912)

<223>

<220>

<221> promoter

<222> (1864)..(1902)

<223> TK-min

<220>

<221> protein_bind

<222> (1913)..(2212)

<223> TetO7

<220>

<221> misc_feature

<222> (2213)..(2709)
 <223> CMV-min + Intron

<220>
 <221> promoter
 <222> (2226)..(2264)
 <223> CMV-min
 <220>
 <221> gene
 <222> (2710)..(4308)
 <223> Humanes sinige-chain IL-12

<220>
 <221> mutation
 <222> (4020)..(4023)
 <223> T/C, A/T, G/C, T/G

<400> 3

ctgctggttc	tttccgcctc	agaagccata	gagcccaccg	catccccagc	atgcctgcta	60
ttgtcttccc	aatcctcccc	cttgtctgtc	tgccccaccc	cacccccag	aatagaatga	120
cacctactca	gacaatgcga	tgcaatttcc	tcattttatt	aggaaaggac	agtgggagtg	180
gcaccttcca	gggtcaagga	aggcacgggg	gaggggcaaa	caacagatgg	ctgggaacta	240
gaaggcacag	tcgaggctga	tcagcgagct	ctagcattta	ggtgacacta	tagaataggg	300
ccctctagga	tcgatcctcg	cgccccctac	ccaccgtact	cgtcaattcc	aagggcatcg	360
gtaaaccatct	gctcaaaactc	gaagtcggcc	atatccagag	cgccgtaggg	ggcggagtcg	420
tggggggtaa	atcccggacc	cggggaatcc	ccgtccccca	acatgtccag	atcgaaatcg	480
tctagcgcgt	cggcatgcgc	catcgccacg	tcctcgccgt	ctaagtggag	ctcgtcccc	540
aggctgacat	cggctcggggg	ggccgtggac	agtctgcgcg	tgtgtcccgc	ggggagaaaag	600
gacaggcgcg	gagccgccag	ccccgcctct	tcggggggcgt	cgtcgtccgg	gagatcgagc	660
aggccctcga	tggtagaccc	gtaattgttt	ttcgtacgcg	cgcggtctga	cgcggaacca	720
ctttcacatt	taagttgttt	ttctaattccg	catatgatca	attcaaggcc	gaataagaag	780
gctggctctg	caccttggtg	atcaaataat	tcgatagctt	gtcgtataata	tggcggcata	840
ctatcagtag	taggtgtttc	cctttcttct	ttagcgactt	gatgctcttg	atcttccaat	900
acgcaaccta	aagtaaaatg	ccccacagcg	ctgagtgcatt	ataatgcatt	ctctagtga	960
aaaccttggt	ggcataaaaa	ggctaattga	ttttcgagag	tttcatactg	ttttctgtga	1020
ggcgtgtac	ctaaatgtac	ttttgctcca	tcgcgatgac	ttagtaaagc	acatctaaaa	1080
cttttagcgt	tattacgtaa	aaaatcttgc	cagctttccc	cttctaaagg	gcaaaagtga	1140
gtatggtgcc	tatctaaccat	ctcaatggct	aaggcgtcga	gcaaagcccg	cttatttttt	1200
acatgccaat	acaatgtagg	ctgctctaca	cctagcttct	ggcgagttt	acgggttgtt	1260
aaaccttcga	ttccgacctc	attaagcagc	tctaattgcgc	tgttaatcac	tttactttta	1320
tctaattctag	agggctctggg	tctctttggc	atggctgaat	taattcgcgt	cgagccggcc	1380
gcgggtacaa	ttccggttgg	acctgggagt	ggacacctgt	ggagagaaaag	gcaaaagtga	1440
tgtcattgtc	actcaagtgt	atggccagat	ctcaagcctg	ccacacctca	agcttgacaa	1500
caaaaagatt	gtcttttctg	accagatgga	cgcgccacc	ctcaaaggca	tcaccgcggg	1560
ccaggtgaat	atcaaatcct	cctcgttttt	ggaaactgac	aatcttagcg	cagaagtcatt	1620
gcccgttttt	gagagggagt	actcacccca	acagtcgaga	ggttttccga	tccggtcgat	1680
gcggactcgc	tcagggtccct	cgggtggcga	gtaccgttcg	gaggccgacg	ggtttccgat	1740
ccaagagtac	tggaaagacc	gcgaagagtt	tgtcctcaac	cgcgagccca	acaggcgtcg	1800
aagcttgatg	ggtcgctcgg	tgttcgaggc	cacacgcgtc	accttaatat	gcgaagtgga	1860
cctcggaccg	cgccgccccg	actgcattctg	cgtgttcgaa	ttgcccggcg	agctcgactt	1920
tcacttttct	ctatcactga	tagggagtg	taaactcgac	tttcaacttt	ctctatcact	1980
gatagggagt	ggtaaaactcg	actttcactt	ttctctatca	ctgataggga	gtggtaaact	2040
cgactttcac	ttttctctat	cactgatagg	gagtggtaaa	ctcgactttc	acttttctct	2100
atcactgata	gggagtggta	aactcgactt	tcacttttct	ctatcactga	tagggagtg	2160
taaaactcgac	tttcaacttt	ctctatcact	gatagggagt	ggtaaaactcg	acggtcgagg	2220
gtcagtagtg	cgtgtacggg	gggaggccta	tataagcaga	gctcgtttag	tgaaccgtca	2280
gatcgcctgg	agacgccatc	cacgctgttt	tgacctccat	agaagacacc	gggaccgatc	2340
cagcctccgc	ggccccgaat	tgcgaagctt	tattgcggta	gtttatcaca	gttaaatg	2400
taacgcagtc	agtgttctg	acacaacagt	ctcgaactta	agctgcagaa	gttggtcgtg	2460
aggcactggg	caggtaagta	tcaagggttac	aagacaggtt	taaggagacc	aatagaaact	2520
gggcttgtcg	agacagagaa	gactcttgcg	tttctgatag	gcacctattg	gtcttactga	2580

catccacttt	gcctttctct	ccacaggtgt	ccactcccag	ttcaattaca	gctcttaagg	2640
ctagagtact	taatacgact	cactataggg	tagcctcgag	aattcacgag	tgggtaccgag	2700
ctcggatcca	tgggtcacca	gcagttggtc	atctcttggt	tttccctggt	ttttctggca	2760
tctccctcgt	tggccatatg	ggaactgaag	aaagatgttt	atgtcgtaga	attggattgg	2820
tatccggatg	cccctggaga	aatggtggtc	ctcacctgtg	acacccctga	agaagatggt	2880
atcacctgga	ccttggacca	gagcagtgag	gtcttaggct	ctggcaaaac	cctgaccatc	2940
caagtcaaaag	agtttggaga	tgctggccag	tacacctgtc	acaaaggagg	cgaggttcta	3000
agccattcgc	tcctgctgct	tcacaaaaag	gaagatggaa	tttgggtccac	tgatatttta	3060
aaggaccaga	aagaacccaa	aaataagacc	tttctaagat	gcgaggccaa	gaattattct	3120
ggacgtttca	cctgctggtg	gctgacgaca	atcagtactg	atttgacatt	cagtgctaaa	3180
agcagcagag	gctcttctga	cccccaaggg	gtgacgtgcg	gagctgctac	actctctgca	3240
gagagagtca	gaggggacaa	caaggagtat	gagtactcag	tggagtgccca	ggaggacagt	3300
gectgccag	ctgctgagga	gagtctgccc	attgaggtca	tgggtggatgc	cgttcacaaag	3360
ctcaagtatg	aaaactacac	cagcagcttc	ttcatcaggg	acatcatcaa	acctgaccca	3420
cccaacaact	tgcagctgaa	gccattaaag	aattctcggc	aggtggagggt	cagctgggag	3480
tacctgaca	cctggagtac	tccacattcc	tacttctccc	tgacattctg	cgttcaggtc	3540
cagggcaaga	gcaagagaga	aaagaaagat	agagtcttca	cggacaagac	ctcagccacg	3600
gtcatctgcc	gcaaaaatgc	cagcattagc	gtgcgggccc	aggaccgcta	ctatagctca	3660
tcttggagcg	aatgggcatc	tgtgccctgc	agtgggtggc	gtggcgggcg	atctagaaac	3720
ctcccctggt	ccactccaga	cccaggaatg	ttcccattgc	ttcaccactc	ccaaaacctg	3780
ctgagggcgg	tcagcaacat	gctccagaag	gccagacaaa	ctctagaatt	ttacccttgc	3840
acttctgaag	agattgatca	tgaagatata	acaaaagata	aaaccagcac	agtgaggagg	3900
tgtttaccat	tggaaattaac	caagaatgag	agttgcctaa	attccagaga	gacctcttct	3960
ataactaatg	ggagttgcct	ggcctccaga	aagacctctt	ttatgatggc	cctgtgcctc	4020
tcgagtattt	atgaagactc	gaagatgtac	caggtggagt	tcaagaccat	gaatgcaaag	4080
cttctgatgg	atcctaagag	gcagatcttt	ctagatcaaa	acatgctggc	agttattgat	4140
gagctgatgc	aggccctgaa	tttcaacagt	gagactgtgc	cacaaaaatc	ctcccttgaa	4200
gaaccggatt	tttataaaac	taaaatcaag	ctctgcatac	ttcttcatgc	tttcagaatt	4260
cgggcagtg	ctattgatag	agtgatgagc	tatctgaatg	cttcctaaaa	agcgaggtcg	4320
atccggatta	gtccaatttg	ttaaagacag	gatatacgtg	gtccaggctc	tagttttgac	4380
tcaacaatat	caccagctga	agcctataga	gtacgagcca	tagataaaat	aaaagatttt	4440
atttagtctc	cagaaaaagg	ggggaatgaa	agacccacc	tgtaggtttg	gcaagctagt	4500
aacggccggc	agtgtgctgg	aattctgcag	atatccatca	cactggcggc	cgctcgagca	4560
tgcacttaga	gggccctatt	ctatagtgtc	acctaaatgc	tagagctcgc	tgatcagcct	4620
cgactgtgcc	ttctagtgtc	cagccatctg	ttgtttgccc	ctcccccggt	ccttccttga	4680
ccctgggaag	tgccactccc	actgtccttt	cctaataaaa	tgaggaaatt	gcatcgcat	4740
gtctgagtga	gtgtcattct	attctggggg	gtgggggtgg	gcaggacagc	aagggggagg	4800
attgggaaga	caatagcagg	catgctgggg	atgcggtggg	ctctatggct	tctgaggcgg	4860
aaagaaccag	tcgactcgaa	gatctggggc	tgggtaaagg	tgggaaagaa	tatataaggt	4920
gggggtctta	tgtagttttg	tatctgtttt	gcagcagccg	ccgccgccat	gagcaccaac	4980
tcgtttgatg	gaagcattgt	gagctcatat	ttgacaacgc	gcatgcccc	atgggcccgg	5040
gtgcgtcaga	atgtgatggg	ctccagcatt	gatggctgcc	ccgtcctgcc	cgcaaacctc	5100
actaccttga	cctacgagac	cgtgtctgga	acgccgttgg	agactgcagc	ctccgccgcc	5160
gcttcagccg	ctgcagccac	cgcccgcggg	attgtgactg	actttgcttt	cctgagcccg	5220
cttgcaagca	gtgcagcttc	ccgttcatcc	gcccgcgatg	acaagttgac	ggctcttttg	5280
gcacaattgg	attctttgac	ccgggaacct	aatgtcgttt	ctcagcagct	gttggtatctg	5340
cgccagcagg	tttctgccct	gaaggcttcc	tcccctccca	atgcggttta	aaacataaat	5400
aaaaaaccag	actctgtttg	gatttggatc	aagcaagtgt	cttgctgtct	ttatttaggg	5460
gttttgcgcg	cgcggtaggc	ccgggaccag	cgggtctcgg	cgttgagggt	cctgtgtatt	5520
ttttccagga	cgtggtaaa	gtgactctgg	atgttcagat	acatgggcat	aagcccgtct	5580
ctgggggtgga	ggtagcacca	ctgcagagct	tcatgctcgc	gggtgggtgt	gtagatgatc	5640
cagtcgtagc	aggagcgctg	ggcgtgggtg	ctaaaaatgt	ctttcagtag	caagctgatt	5700
gccaggggca	ggcccttggt	gtaagtgttt	acaaagcggt	taagctggga	tgggtgcata	5760
cgtggggata	tgagatgcat	cttggactgt	atttttaggt	tggctatgtt	cccagccata	5820
tccctccggg	gattcatgtt	gtgcagaacc	accagcacag	tgtatccggg	gcacttggga	5880
aatttgtcat	gtagcttaga	aggaaatgcg	tggagaagct	tggagacgcc	cttgtgacct	5940
ccaagatttt	ccatgcattc	gtccataatg	atggcaatgg	gcccacgggc	ggcggccctg	6000
gcgaagatat	ttctgggata	actaacgtca	cttctgtgtt	ccaggatgag	atcgtcatag	6060
gccattttta	caaagcgcg	gcggagggtg	ccagactcgc	gtataatggt	tccatccggc	6120
ccaggggctg	agttaccctc	acagatttgc	atttcccacg	ctttgagttc	agatgggggg	6180
atcatgtcta	cctgcggggc	gatgaagaaa	acggtttccg	gggtagggga	gatcagctgg	6240

gaagaaagca	ggttcctgag	cagctgcgac	ttaccgcagc	cggtgggccc	gtaaatcaca	6300
cctattaccg	ggtgcaactg	gtagttaaga	gagctgcagc	tgccgtcatc	cctgagcagg	6360
ggggccactt	cgtaagcat	gtccctgact	cgcatgtttt	ccctgaccaa	atccgccaga	6420
aggcgctcgc	cgcccagcga	tagcagttct	tgcaaggaa	caaagttttt	caacgggttg	6480
agaccgtccg	ccgtaggcat	gcttttgagc	gtttgaccaa	gcagttccag	gcggtcccac	6540
agctcgggtc	cctgctctac	ggcatctcga	tccagcatat	ctcctcgttt	cgcgggttgg	6600
ggcggctttc	gctgtacggc	agtagtcggg	gctcgtccag	acgggccagg	gtcatgtctt	6660
tccacgggcy	cagggtcctc	gtcagcgtag	tctgggtcac	ggtgaagggg	tgcgctccgg	6720
gctgcgcgct	ggccagggtg	cgcttgagge	tggtcctgct	ggtgctgaag	cgctgccggg	6780
cttcgccctg	cgcgtcggcc	aggtagcatt	tgaccatggt	gtcatagtcc	agccccctcg	6840
cggcgtggcc	cttggcgcgc	agcttgccct	tggaggaggc	gccgcacgag	gggcagtgca	6900
gacttttgag	ggcgtagagc	ttgggcgcga	gaaataccga	ttccggggag	taggcattccg	6960
cgccgcaggc	cccgcagacg	gtctcgcatt	ccacgagcca	ggtgagctct	ggccgttcgg	7020
ggtcaaaaac	cagggtttccc	ccatgctttt	tgatgcgttt	cttacctctg	gtttccatga	7080
gccggtgtcc	acgctcgggtg	acgaaaaggc	tgctcgtgtc	cccgtataca	gacttgagag	7140
ggagtttaaa	cgaattcaat	agcttggtgc	atgggcggcg	atataaaatg	caagggtgctg	7200
ctcaaaaaat	caggcaaaagc	ctcgcgcaaa	aaagaaagca	catcgtagtc	atgctcatgc	7260
agataaaggc	aggtaagctc	cggaaaccac	acagaaaaag	acaccatttt	tctctcaaac	7320
atgtctgcgg	gtttctgcat	aaacacaaaa	taaaataaca	aaaaaacatt	taaacattag	7380
aagcctgtct	tacaacagga	aaaacaaccc	ttataagcat	aagacggact	acggccatgc	7440
cggcgtgacc	gtaaaaaaac	tggtcaccgt	gattaaaaag	caccaccgac	agctcctcgg	7500
tcatgtccgg	agtcataatg	taagactcgg	taaacacatc	aggttgattc	atcggtcagt	7560
gctaaaaagc	gaccgaaata	gcccggggga	atacatacc	gcaggcgtag	agacaacatt	7620
acagccccca	taggaggtat	aacaaaatta	ataggagaga	aaaacacata	aacacctgaa	7680
aaaccctcct	gcctaggcaa	aatagcacc	tcccgctcca	gaacaacata	cagcgcttca	7740
cagcggcagc	ctaacagtca	gccttaccag	taaaaaagaa	aacctattaa	aaaaacacca	7800
ctcgacacgg	caccagctca	atcagtcaca	gtgtaaaaaa	gggccaagtg	cagagcgagt	7860
atatatagga	ctaaaaaatg	acgtaacggg	taaagtccac	aaaaaacacc	cagaaaaccg	7920
cacgcgaacc	tacgcccaga	aacgaaagcc	aaaaaaccca	caacttcctc	aaatcgtcac	7980
ttccgthttc	ccacgttacg	taacttcccc	ttttaagaaa	actacaattc	ccaacacata	8040
caagttactc	cgccttaaaa	cctacgtcac	ccgccccgtt	cccacgcctc	gcgcacagtc	8100
acaaactcca	ccccctcatt	atcatattgg	cttcaatcca	aaataaggta	tattattgat	8160
gatgttaatt	aacatgcatg	gatccatatg	cgggtgtgaa	taccgcacag	atgcgttaagg	8220
agaaaaatcc	gcatcaggcg	ctcttccgct	tectcgctca	ctgactcgct	gcgctcggtc	8280
gttcggctgc	ggcgagcggt	atcagctcac	tcaaaggcgg	taatacgggt	atccacagaa	8340
tcaggggata	acgcaggaaa	gaacatgtga	gcaaaaggcc	agcaaaaggc	caggaaaccgt	8400
aaaaaggccg	cgttgctggc	gtttttccat	aggctccgcc	cccctgacga	gcatcacaaa	8460
aatcgacgct	caagtcagag	gtggcgaaac	ccgacaggac	tataaagata	ccaggcgtht	8520
ccccctggaa	gctccctcgt	gcgctctcct	gttccgaccc	tgccgcttac	cggatacctg	8580
tccgcctttc	tcccttcggg	aagcgtggcg	ctttctcata	gctcacgctg	taggtatctc	8640
agttcgggtg	aggctcgttcg	ctccaagctg	ggctgtgtgc	acgaaccccc	cgttcagccc	8700
gaccgctgcg	ccttatccgg	taactatcgt	cttgagtcca	accgggtaag	acacgactta	8760
tcgccactgg	cagcagccac	tggtaacagg	attagcagag	cgaggatagt	aggcgggtgt	8820
acagagttct	tgaagtgggtg	gcctaactac	ggctacacta	gaaggacagt	atthgggtatc	8880
tgcgctctgc	tgaagccagt	taccttcgga	aaaagagttg	gtagctcttg	atccggcaaa	8940
caaaccaccg	ctggtagcgg	tggttttttt	gtttgcaagc	agcagattac	gcgcagaaaa	9000
aaaggatctc	aagaagatcc	tttgatcttt	tctacggggg	ctgacgctca	gtggaacgaa	9060
aactcacgtt	aagggatttt	ggtcatgaga	ttatcaaaaa	ggatcttcac	ctagatcctt	9120
ttaaattaaa	aatgaagttt	taaatcaatc	taaagtatat	atgagtaaac	ttggtctgac	9180
agttaccaat	gcttaatcag	tgaggcacct	atctcagcga	tctgtctatt	tcgttcattcc	9240
atagttgcct	gactccccgt	cgtgtagata	actacgatac	gggagggtct	accatctggc	9300
cccagtgctg	caatgatacc	gcgagaccca	cgctcaccgg	ctccagattt	atcagcaata	9360
aaccagccag	ccggaagggg	cgagcgcaga	agtggtcctg	caactttatc	cgcctccatc	9420
cagtctatta	attgthgccc	ggaagctaga	gtaagtagtt	cgccagttaa	tagtttgccg	9480
aacgttgthg	ccattgctgc	agccatgaga	ttatcaaaaa	ggatcttcac	ctagatcctt	9540
ttcacgtaga	aagccagtc	gcagaaacgg	tgctgacccc	ggatgaatgt	cagctactgg	9600
gctatctgga	caaggggaaa	cgcaagcgca	aagagaaagc	aggtagcttg	cagtgggctt	9660
acatggcgat	agctagactg	ggcggtttta	tggacagcaa	gcaaacggga	attgccagct	9720
ggggcgccct	ctggtaagggt	tggaagccc	tgcaaagtaa	actggatggc	ttctcgcgg	9780
ccaaggatct	gatggcgag	gggatcaagc	tctgatcaag	agacaggatg	aggatcgtht	9840
cgcattgattg	aacaagatgg	attgcacgca	ggttctccgg	ccgcttgggg	ggagaggcta	9900

```

ttcggctatg actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg 9960
tcagcgcagg ggcgcccggg tctttttgtc aagaccgacc tgtccgggtg cctgaatgaa 10020
ctgcaagacg aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgcgcagct 10080
gtgctcgacg ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg 10140
caggatctcc tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca 10200
atgcggcggc tgcatacgct tgatccggct acctgcccac tcgaccacca agcgaaacat 10260
cgcacgcagc gagcacgtac tcggatggaa gccgggtctt tcgatcagga tgatctggac 10320
gaagagcatc aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gagcatgccc 10380
gacggcgagg atctcgtcgt gacccatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa 10440
aatggccgct tttctggatt catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag 10500
gacatagcgt tggctacccg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc 10560
ttcctcgtgc tttacgggtat cgccgctccc gattcgcagc gcacgcctt ctatcgctt 10620
cttgacgagt tcttctgaat tttgttaaaa tttttgttaa atcagctcat tttttaacca 10680
ataggcgcga atcggcaaca tcccttataa atcaaaagaa tagaccgga tagggttgag 10740
tgttgttcca gtttggaaca agagtccact attaaagaac gtggactcca acgtcaaagg 10800
gcgaaaaacc gtctatcagg gcgatggccc actacgtgaa ccatcaccca aatcaagttt 10860
tttgccggtc aggtgccgta aagctctaaa tcggaaccct aaagggagcc cccgatttag 10920
agcttgacgg ggaagccggc cgaacgtggc gagaaaggaa ggaagaaaag cgaaaggagc 10980
ggcgctagg gcgctggcaa gtgtagcggc cacgctgcgc gtaaccacca caccgcgcgc 11040
cttaatgcgc cgctacagg cgcgctccatt cgccattcag gatcgaatta attcttaagt 11100
ttttbtaaca tcatcaataa tataccttat tttggattga agccaatatg ataatgaggg 11160
ggtggagttt gtgacgtggc gcggggcggt ggaacggggc ggggtgacgta gtagtgtggc 11220
ggaagtgtga tgttgcaagt gtggcggaac acatgtaagc gacggatgtg gcaaaagtga 11280
cgtttttggg gtgcgccggg gtacacagga agtgacaatt ttcgcgcggg tttaggcgga 11340
tgttgtagta aatttgggcg taaccgagta agatttggcc attttcgcgg gaaaactgaa 11400
taagaggaag tgaaatctga ataattttgt gttactcata gcgcgtaata ctg 11453

```

<210> 4

<211> 9784

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Adenovirales Expressionsplasmid pAd.3r zur regulierten Expression

<220>

<221> gene

<222> (327) .. (713)

<223> VP16

<220>

<221> gene

<222> (714) .. (1352)

<223> TetR

<220>

<221> Intron

<222> (1353) .. (1912)

<223>

<220>

<221> promoter

<222> (1864) .. (1902)

<223> TK-min

<220>

<221> protein_bind

<222> (1913) .. (2212)

<223> TetO7

<220>

<221> misc_feature

<222> (2213)..(2709)

<223> CMV-min + Intron

<220>

<221> promoter

<222> (2226)..(2264)

<223> CMV-min

<220>

<221> multiple cloning site

<222> (2669)..(2770)

<223> NheI, XhoI, KpnI, BamHI, SpeI, EcoRV, NotI, XhoI

<400> 4

ctgctgggttc	tttccgcctc	agaagccata	gagcccaccg	catccccagc	atgcctgcta	60
ttgtcttccc	aatcctcccc	cttgcgtgcc	tgccccaccc	cacccccag	aatagaatga	120
cacctactca	gacaatgcga	tgcaatttcc	tcatttttatt	aggaaaaggac	agtgggagtg	180
gcaccttcca	gggtcaagga	aggcacgggg	gaggggcaaa	caacagatgg	ctggcaacta	240
gaaggcacag	tcgaggctga	tcagcgagct	ctagcattta	ggtgacacta	tagaataggg	300
ccctctagga	tcgatcctcg	cgccccctac	ccaccgtact	cgtcaattcc	aagggcatcg	360
gtaaacaatct	gctcaaaactc	gaagtcggcc	atatccagag	cgccgtaggg	ggcggagtcg	420
tgggggggtaa	atccccggacc	cggggaatcc	ccgtccccca	acatgtccag	atcgaaatcg	480
tctagcgcgt	cggcatgcgc	catcgccacg	tcctcgccgt	ctaagtggag	ctcgtcccc	540
aggctgacat	cggtcggggg	ggccgtggac	agtctgcgcg	tgtgtcccg	ggggagaaaag	600
gacaggcgcg	gagccgccag	ccccgcctct	tcggggggcgt	cgtcgtccgg	gagatcgagc	660
aggccctcga	tggtagaccc	gtaattgttt	ttcgtacgcg	cgcggtgta	cgcggaacca	720
ctttcacatt	taagttgttt	ttctaattccg	catatgatca	attcaaggcc	gaataagaag	780
gctggctctg	caccttggtg	atcaaataat	tcgatagctt	gtcgtataata	tggcggcata	840
ctatcagtag	taggtgtttc	cctttcttct	ttagcgactt	gatgctcttg	atcttccaat	900
acgcaacctta	aagtaaaatg	ccccacagcg	ctgagtgcat	ataatgcatt	ctctagttaa	960
aaaccttggt	ggcataaaaa	ggctaattga	ttttcgagag	tttcatactg	tttttctgta	1020
ggccgtgtac	ctaaatgtac	ttttgctcca	tcgcgatgac	ttagtaaagc	acatctaaaa	1080
cttttagcgt	tattacgtaa	aaaatcttgc	cagctttccc	cttctaaagg	gcaaaagtga	1140
gtatggtgcc	tatctaact	ctcaatggct	aaggcgtcga	gcaaagcccg	cttatttttt	1200
acatgccaat	acaatgtagg	ctgctctaca	cctagcttct	gggcgagttt	acgggttggt	1260
aaaccttcga	ttccgacctc	attaagcagc	tctaattgcg	tgttaatcac	tttactttta	1320
tctaattctag	agggtctggg	tctctttggc	atggtcgaat	taattcgcgt	cgagccggcc	1380
gcgggtacaa	ttccggttgg	acctgggagt	ggacacctgt	ggagagaaaag	gcaaaagtga	1440
tgtcattgtc	actcaagtgt	atggccagat	ctcaagcctg	ccacacctca	agcttgacaa	1500
caaaaagatt	gtcttttctg	accagatgga	cgcgccacc	ctcaaaggca	tcaccgcggg	1560
ccaggtgaat	atcaaatact	cctcgttttt	ggaaactgac	aatcttagcg	cagaagtcac	1620
gcccgccttt	gagagggagt	actcacccca	acagtcgaga	ggttttccga	tcgggtcgat	1680
gcggactcgc	tcaggtccct	cgggtggcgga	gtaccgttcg	gaggccgacg	ggtttccgat	1740
ccaagagtac	tggaaaagacc	gcgaagagtt	tgtcctcaac	cgcgagccca	acaggcgtcg	1800
aagcttgatg	ggtcgctcgg	tgttcgaggc	cacacgcgtc	accttaatat	gcgaagtggg	1860
cctcggaccg	cgccgccccg	actgcactcg	cgtgttcgaa	ttgccggcg	agctcgactt	1920
tcacttttct	ctatcactga	tagggagtgg	ttaaactcgac	tttactttt	ctctatcact	1980
gatagggagt	ggtaaaactcg	actttcactt	ttctctatca	ctgataggga	gtggtaaact	2040
cgactttcac	ttttctctat	cactgatagg	gagtggtaaa	ctcgactttc	acttttctct	2100
atcactgata	gggagtggta	aactcgactt	tcacttttct	ctatcactga	tagggagtgg	2160
taaactcgac	tttactttt	ctctatcact	gatagggagt	ggtaaaactcg	acggtcgagg	2220
gtcagtagg	cgtgtacgg	gggaggccta	tataagcaga	gctcgtttag	tgaaccgtca	2280
gatcgcctgg	agacagccatc	cacgctgttt	tgacctcatt	agaagacacc	gggaccgatc	2340
cagcctcccg	ggccccgaat	tgcgaagctt	tattgcggta	gtttatcaca	gttaaattgc	2400
taacgcagtc	agtgcctctg	acacaacagt	ctcgaactta	agctgcagaa	gttggctcgtg	2460
aggcactggg	caggtaagta	tcaaggttac	aagacagggt	taaggagacc	aatagaaact	2520
gggcttgctg	agacagagaa	gactcttgcg	tttctgatag	gcacctattg	gtcttactga	2580

catccacttt	gcctttctct	ccacaggtgt	ccactcccag	ttcaattaca	gctcttaagg	2640
ctagagtact	taatacgact	cactataggg	tagcctcgag	aattcacgag	tggtaccgag	2700
ctcggatcca	ctagtaacgg	ccgccagtgt	gctggaattc	tgagatatac	catcacactg	2760
gcggccgctc	gagcatgcat	ctagagggcc	ctattctata	gtgtcaccta	aatgctagag	2820
ctcgtcgatc	agcctcgact	gtgccttcta	gttgccagcc	atctgttgtt	tgccctccc	2880
ccgtgccttc	cttgaccctg	gaaggtgcca	ctcccactgt	cctttcctaa	taaaatgagg	2940
aaattgcata	gcattgtctg	agtaggtgtc	attctattct	gggggggtggg	gtggggcagg	3000
acagcaaggg	ggaggattgg	gaagacaata	gcaggcatgc	tggggatgag	gtgggctcta	3060
tggtcttctga	ggcggaaga	accagtcgac	atcgatgcta	gagtggaagg	tgctgaggtg	3120
cgatgagacc	cgcaccaggt	gcagaccctg	cgagtgtggc	ggtaaacata	ttaggaacca	3180
gcctgtgatg	ctggatgtga	ccgaggagct	gaggcccgat	cacttggtgc	tggtcgtcac	3240
ccgcgctgag	tttggtctta	gcgatgaaga	tacagattga	ggtagtgaaa	tggtggggcg	3300
tggtcttaagg	gtgggaaaga	atatataagg	tgggggtctt	atgtagtgtt	gtatctgttt	3360
tgagcagacc	gccgccgcca	tgagcaccaa	ctcgtttgat	ggaagcattg	tgagctcata	3420
tttgacaacg	cgcagtcctc	catgggccc	gggtgcgtcag	aatgtgatgg	gctccagcat	3480
tgatggctgc	cccgtcctgc	ccgcaaacct	tactaccttg	acctacgaga	ccgtgtctgg	3540
aacgccgttg	gagactgcag	cctccgccgc	cgcttcagcc	gctgcagcca	ccgcccgagg	3600
gattgtgact	gactttgctt	tcttgagccc	gcttgcaagg	agtgcagctt	cccgttcata	3660
cgcccgcgat	gacaagttga	cggctctttt	ggcacaattg	gattctttga	ccggggaact	3720
taatgtcgtt	tcttcagcgc	tggttgatct	gcgccagcag	gtttctgccc	tgaaggcttc	3780
ctccctccc	aatgcggttt	aaaacataaa	tcaaaaacca	gactctgttt	ggatttggtg	3840
caagcaagtg	tcttgctgtc	tttatttagg	gggtttgcgc	gcgcggtagg	ccggggacca	3900
gcggtctcgg	tcgttgaggg	tctgtgtgat	tttttccagg	acgtggtaaa	ggtgactctg	3960
gatgttcaga	tacatgggca	taagcccgtc	tctgggggtg	aggtagcacc	actgcagagc	4020
ttcatgctgc	gggggtgggt	tgtagatgat	ccagtcgtag	caggagcgct	gggcgtgggt	4080
cctaaaaatg	tctttcagta	gcaagctgat	tgccaggggc	aggcccttgg	tgtaagtgtt	4140
tacaaagcgg	ttaagctggg	atgggtgcat	acgtggggat	atgagatgca	tcttgactg	4200
tatttttagg	ttggctatgt	tcacagccat	atccctccgg	ggattcatgt	tggtgcagaac	4260
caccagcaca	gtgtatccgg	tgactttggg	aaatttgtca	tgtagcttag	aaggaaatgc	4320
gtggaagaac	ttggagagcg	ccttgtagcc	tccaagattt	tccatgcatt	cgtccataat	4380
gatggcaatg	ggcccaggg	cggcgccctg	ggcgaagata	tttctgggat	cactaacgtc	4440
atagttgtgt	tccaggatga	gatcgtcata	ggccattttt	acaaagcgcg	gcggagggtg	4500
gccagactgc	ggtataatgg	ttccatccgg	cccagggggc	tagttaccct	cacagatttg	4560
catttcccac	gctttgagtt	cagatggggg	gatcatgtct	acctgcgggg	cgatgaagaa	4620
aacgggtttc	ggggtagggg	agatcagctg	ggaagaaagc	aggttcctga	gcagctgcga	4680
cttaccgcag	ccggtggggc	cgtaaatcac	acctattacc	gggtgcaact	ggtagttaag	4740
agagctgcag	ctgccgtcat	ccctgagcag	gggggccact	tcgttaagca	tgtccctgac	4800
tcgcatgttt	tccctgacca	aatccgccag	aaggcgctcg	ccgccagcgg	atagcagttc	4860
ttgcaaggaa	gcaaagtttt	tcaacggttt	gagaccgtcc	gccgtaggca	tgcttttgag	4920
cgtttgacca	agcagttcca	ggcggtccca	cagctcggtc	acctgctcta	cggcatctcg	4980
atccagcata	tctcctcggt	tcgcgggttg	ggcgggcttt	cgctgtacgg	cagtgtcggg	5040
tgctcgcca	gacgggccag	ggtcatgtct	ttccacgggc	gcagggtcct	cgtcagcgta	5100
gtctgggtca	cggtgaaggg	gtgcgctccg	ggctgcgcgc	tgccaggggt	gcgcttgagg	5160
ctggtcctgc	tggtgctgaa	gcgctgcggg	tcttcgccct	gcgcgtcggc	caggtagcat	5220
ttgaccatgg	tgcatagtc	cagcccctcc	gcggcggtgg	ccttggcggc	cagcttgccc	5280
ttggaggagg	cgccgcacga	ggggcagtcg	agacttttga	gggcgtagag	cttgggcggc	5340
agaaataacc	attccggggg	gtaggcatcc	gcgccgcagg	ccccgcagac	ggtctcgcac	5400
tccacgagcc	aggtagcttc	tgcccggtcg	gggtcaaaaa	ccagggtttc	cccatgcttt	5460
ttgatgcgtt	tcttacctct	gggtttccatg	agccggtgtc	cacgctcggg	gacgaaaagg	5520
ctgtccgtgt	ccccgtatac	agacttgaga	ggcctgtcct	cgaccgatgc	ccttgagagc	5580
cttcaacca	gtcagctcct	tccggtgggc	gcggggcatg	actatcgctg	ccgcacttat	5640
gactgtcttc	tttatcatgc	aactcgtagg	acagggtgcc	gcagcgctct	gggtcatttt	5700
cggcgaggac	cgctttcgct	ggagcgcgac	gatgatcggc	ctgtcgcttg	cgggtattcg	5760
aatcttgac	gccctcgctc	aagccttcgt	cactgggtccc	gccaccaaac	gtttcggcga	5820
gaagcaggcc	attatcgccg	gcatggcggc	cgacgcgctg	ggctacgtct	tgctggcggt	5880
cgcgacgcga	ggctggatgg	ccttccccat	tatgattctt	ctcgcttcgg	gcggcatcgg	5940
tatgcccgcg	ttgcaggcca	tgctgtccag	gcaggtagat	gacgaccatc	agggacagct	6000
tcaaggatcg	ctcgcggctc	ttaccagcct	aacttcgata	actggaccgc	tgatcgtcac	6060
ggcgatttat	ggcgccctcg	cgagcacatc	gaacgggttg	gcatggattg	taggcgccgc	6120
cctatacctt	gtctgcctcc	ccgcgttgcg	tcgcgggtgca	tgagagccgg	ccacctcgac	6180
ctgaatggaa	gccggcgcca	cctcgctaac	ggattcacca	ctccaagaat	tgagaccaat	6240

caattcttgc	ggagaactgt	gaatgcgcaa	accaaccctt	ggcagaacat	atccatcgcg	6300
tccgccatct	ccagcagccg	cacgcggcgc	atctcgggca	gcgttgggtc	ctggccacgg	6360
gtgcgcatga	togtgcctct	gtcgttgagg	acccggctag	gctggcgggg	ttgccttact	6420
ggtttagcaga	atgaatcacc	gatacgcgag	cgaacgtgaa	gcgactgctg	ctgcaaaacg	6480
tctgcgacct	gagcaacaac	atgaatggtc	ttcgggtttcc	gtgttttcgta	aagtctggaa	6540
acgcggaagt	cagcgccctg	caccattatg	ttccggatct	gcacgcgagg	atgctgctgg	6600
ctaccctgtg	gaacacctac	atctgtatta	acgaagcgct	ggcattgacc	ctgagtgttt	6660
tttctctggg	cccgcgcgat	ccataccgcc	agttgtttac	cctcacaacg	ttccagtaac	6720
cgggcatggt	catcatcagt	aaccgcgtatc	gtgagcatcc	tctctcgttt	catcgggtatc	6780
attaccccca	tgaacagaaa	ttccccctta	cacggaggca	tcaagtgacc	aaacaggaaa	6840
aaaccgacct	taacatggcc	cgcttttatca	gaagccagac	attaacgctt	ctggagaaac	6900
tcaacgagct	ggacgcggat	gaacaggcag	acatctgtga	atcgcttcac	gaccacgctg	6960
atgagcttta	ccgcagctgc	ctcgcgcggt	tcggtgatga	cggtgaaaac	ctctgacaca	7020
tgcagctccc	ggagacgggtc	acagcttgct	tgtaaagcga	tgccggggagc	agacaagccc	7080
gtcaggggcg	ctcagcgggt	gttggcgggt	gtcggggcgc	agccatgacc	cagtcacgta	7140
gcgatagcgg	agtgtatact	ggcttaacta	tgcggcatca	gagcagattg	tactgagagt	7200
gcaccatatt	cgggtgtgaaa	taccgcacag	atgcgtaagg	agaaaatacc	gcacagggcg	7260
ctcttccgct	tcctcgcctca	ctgactcgct	gcgctcggtc	gttcggctgc	ggcgagcgggt	7320
atcagctcac	tcaaaggcgg	taatacgggt	atccacagaa	tcagggggata	acgcaggaaa	7380
gaacatgtga	gcaaaaggcc	agcaaaaggc	caggaaaccgt	aaaaaggccg	cgttgtgtggc	7440
gtttttccat	aggctccgcc	cccctgacga	gcatacaaaa	aatcgacgct	caagtcagag	7500
gtggcgaaac	ccgacaggac	tataaagata	ccaggcggtt	ccccctggaa	gctccctcgt	7560
gcgctctcct	gttccgaccc	tgccgcttac	cggatacctg	tccgcctttc	tccttccggg	7620
aagcgtggcg	ctttctcaat	gctcacgctg	taggtatctc	agttcgggtg	aggtcggttcg	7680
ctccaagctg	ggctgtgtgc	acgaaccccc	cgttcagccc	gaccgctgcg	ccttatccgg	7740
taactatcgt	cttgagtcca	acccggtaag	acacgactta	tcgccactgg	cagcagccac	7800
tggttaacagg	attagcagag	cgaggatgtg	aggcggtgct	acagagttct	tgaagtgggtg	7860
gcctaactac	ggctacacta	gaaggacagt	atttggatct	tgcgctctgc	tgaagccagt	7920
taccttcgga	aaaagagttg	gtagctcttg	atccggcaaa	caaaccaccg	ctggtagcgg	7980
tgggtttttt	gtttgcaagc	agcagattac	gcgcagaaaa	aaaggatctc	aagaagatcc	8040
tttgatcttt	tctacggggt	ctgacgctca	gtggaacgaa	aactcacgtt	aagggttttt	8100
ggtcattgaga	ttatcaaaaa	ggatcttcac	ctagatcctt	ttaaattaaa	aatgaagtgt	8160
taaatcaatc	taaagtatat	atgagtaaac	ttggtctgac	agttaccaat	gcttaatcag	8220
tgaggcacct	atctcagcga	tctgtctatt	tcgttcaccc	atagttgcct	gactccccgt	8280
cgtgtagata	actacgatac	gggaggggct	accatctggc	cccagtgcct	caatgatatac	8340
gcgagaccca	cgtccaccgg	ctccagattt	atcagcaata	aaccagccag	ccggaagggc	8400
cgagcgcaga	agtggctcctg	caactttatc	cgcctccatc	cagtctatta	attgttgccg	8460
ggaagctaga	gtaagtagtt	cgccagttaa	tagtttgccg	aacgttggtg	ccattgtctgc	8520
aggcatcgctg	gtgtcacgct	cgctggtttg	tatggcttca	ttcagctccg	gttcccaacg	8580
atcaaggcga	gttacatgat	cccccatgtt	gtgcaaaaaa	gcggttagct	ccttcgggtcc	8640
tccgatcggt	gtcagaagta	agttggccgc	agtgttatca	ctcatgggtta	tggcagcact	8700
gcataattct	cttactgtca	tgccatccgt	aagatgcttt	tctgtgactg	gtgagtactc	8760
aaccaagtca	ttctgagaat	agtgtatgcg	gcgaccgagt	tgctcttgcc	cggcgtcaac	8820
acgggataat	accgcgccac	atagcagaac	tttaaaagtg	ctcatcattg	gaaaacgttc	8880
ttcggggcga	aaactctcaa	ggatcttacc	gctgttgaga	tccagttcga	tgttaaccac	8940
tcgtgcaccc	aactgatctt	cagcatcttt	tactttcacc	agcgtttctg	ggtgagcaaa	9000
aacaggaagg	caaaatgccg	caaaaaaggg	aataaggggc	acacggaaat	ggtgaatact	9060
catactcttc	ctttttcaat	attattgaag	catttatcag	ggttattgtc	tcattgagcgg	9120
atacatatct	gaatgtatct	agaaaaataa	acaaataggg	gttccgcgca	catttccccg	9180
aaaagtgcc	cctgacgtct	aagaaacccat	tattatcatg	acattaacct	ataaaaaatag	9240
gcgtatcacg	aggccctttc	gtcttcaaga	attcttatca	tgacattaac	ctataaaaaat	9300
aggcgtatca	cgaggccctt	tcgtcatcat	caataatata	ccttattttg	gattgaagcc	9360
aatatgataa	tgaggggggtg	gagttttgtga	cgtggcgcg	ggcgtgggaa	cggggcggggt	9420
gacgtagtag	gtggcggaag	gtgtgatggt	gcaagtgtgg	cggaaacacat	gtaagcgccg	9480
gatgtggtaa	aagtgcaggt	tttgggtgtc	gccggtgtat	acgggaagtg	acaattttcg	9540
cgcgggtttta	ggcggatgtt	gtagtaaaat	tgggcgtaac	caagtaaatg	ttggccattt	9600
tcgcgggaaa	actgaataag	aggaagtga	atctgaataa	ttctgtgtta	ctcatagcgc	9660
gtaatatctg	tctagggccg	cggggacttt	gaccgtttac	gtggagactc	gccaggtgt	9720
ttttctcagg	tgttttccgc	gttccgggtc	aaagttggcg	ttttattatt	atagtcagct	9780
ctag						9784

<210> 5
 <211> 9668
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Expressionsplasmid pShuttle.3r zur regulierten
 Expression nach Virusgeneration mittels AdEasy

<220>
 <221> gene
 <222> (327)..(713)
 <223> VP16

<220>
 <221> gene
 <222> (714)..(1352)
 <223> TetR

<220>
 <221> Intron
 <222> (1353)..(1912)
 <223>

<220>
 <221> promoter
 <222> (1864)..(1902)
 <223> TK-min

<220>
 <221> protein_bind
 <222> (1913)..(2212)
 <223> TetO7

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2213)..(2709)
 <223> CMV-min + Intron

<220>
 <221> promoter
 <222> (2226)..(2264)
 <223> CMV-min

<220>
 <221> multiple cloning site
 <222> (2669)..(2770)
 <223> NheI, XhoI, KpnI, SpeI, EcoRV, NotI, XhoI

<400> 5
 ctgctgggttc tttccgcctc agaagccata gagcccaccg catccccagc atgcctgcta 60
 ttgtcttccc aatcctcccc cttgctgtcc tgccccaccc cccccccag aatagaatga 120
 cacctactca gacaatgcga tgcaatttcc tcattttatt aggaaaggac agtgggagtg 180
 gcaccttcca ggggtcaagga aggcacgggg gaggggcaaa caacagatgg ctggcaacta 240
 gaaggcacag tcgaggctga tcagcgagct ctagcattta ggtgacacta tagaataggg 300
 ccctctagga tcgatcctcg cgccccctac ccaccgtact cgtcaattcc aagggcatcg 360
 gtaaacaatct gctcaaaactc gaagtcggcc atatccagag cgccgtaggg ggcggagtcg 420
 tggggggtaa atcccggacc cggggaatcc cgcgtcccca acatgtccag atcgaaatcg 480
 tctagcgcgt cggcatgcgc catcgccacg tcctcgccgt ctaagtggag ctcgcccccc 540
 aggctgacat cggtcggggg ggccgtcgat agtctgcgcg tgtgtcccgc ggggagaaag 600

gacaggcgcg	gagccgccag	ccccgcctct	tcggggggcgt	cgtcgctccgg	gagatcgagc	660
aggccctcga	tggtagaccc	gtaattgttt	ttcgtacgcg	cgcggtctga	cgcggaacca	720
ctttcacatt	taagttgttt	ttctaataccg	catatgatca	attcaaggcc	gaataagaag	780
gctggctctg	caccttggtg	atcaataaat	tcgatagctt	gtcgtataaa	tggcggcata	840
ctatcagtag	taggtgtttc	cctttcttct	ttagcgactt	gatgctcttg	atcttccaat	900
acgcaaccta	aagtaaaatg	ccccacagcg	ctgagtgcac	ataacgcgtt	ctctagttaa	960
aaaccttggt	ggcataaaaa	ggctaattga	ttttcgagag	tttcatactg	tttttctgta	1020
ggcgtgtat	ctgaatgtac	ttttgctcca	ttgcgatgac	ttagtaaaagc	acatctaaaa	1080
cttttagcgt	tattgcgtaa	aaaatcttgc	cagctttccc	cttttaaagg	gcaaaagtga	1140
gtatggtgcc	tatctaaccat	ctcaatggct	aaggcgctga	gcaaagcccg	cttatttttt	1200
acatgccaat	acagtgtagg	ctgctctaca	ccaagcttct	ggcgagttt	acgggttggt	1260
aaaccttcga	ttccgacctc	attaagcagc	tctaattgcg	tgtaatacac	tttactttta	1320
tctaacttag	agggctctggg	tctctttggc	atggctgaat	taattcgcgt	cgagccggcc	1380
gcggtacaa	ttccggttgg	acctgggagt	ggacacctgt	ggagagaaag	gcaaagtggg	1440
tgtcattgtc	actcaagtgt	atggccagat	ctcaagcctg	ccacacctca	agcttgacaa	1500
caaaaagatt	gtcttttctg	accagatgga	cgcgccacc	ctcaaaggca	tcaccgcggg	1560
ccaggtgaat	atcaaatcct	cctcgttttt	ggaaactgac	aatcttagcg	cagaagtcat	1620
gcccgtttt	gagagggagt	actcacccca	acagtcgaga	ggttttccga	tccggtcgat	1680
cggagctgc	tcaggtccct	cggtggcgga	gtaccgttcg	gaggccgacg	ggtttccgat	1740
ccaagagtac	tggaaagacc	gcgaagagtt	tgtcctcaac	cgcgagccca	acaggcgctg	1800
aagcttgatg	ggtcgctcgg	tggtcgaggc	cacacgcgtc	accttaatat	gcgaagtggg	1860
cctcggaacc	cgccgccccg	actgcactct	cgtgttcgaa	ttgcccgggc	agctcgactt	1920
tcacttttct	ctatcactga	tagggagtgg	taaactcgac	tttactttt	ctctatcact	1980
gatagggagt	ggtaaactcg	actttcactt	ttctctatca	ctgataggga	gtggtaaact	2040
cgactttcac	ttttctctat	cactgatagg	gagtggtaaa	ctcgactttc	acttttctct	2100
atcactgata	gggagtggta	aactcgactt	tcacttttct	ctatcactga	tagggagtgg	2160
taaactcgac	tttcactttt	ctctatcact	gatagggagt	ggtaaactcg	acggctcgagg	2220
gtcgagtagg	cgtgtacggt	gggaggccca	tataagcaga	gctcgtttag	tgaaccgtca	2280
gatcgctgg	agacgccatc	cacgctggtt	tgacctccat	agaagacacc	gggaccgatc	2340
cagcctccgc	ggccccgaat	tgcaagctt	tattgcggtg	gtttatcaca	gttaaattgc	2400
taacgcagtc	agtgcctctg	acacaacagt	ctcgaactta	agctgcagaa	gttggtcgtg	2460
aggcactggg	caggtaagta	tcaaggttac	aagacagggt	taaggagacc	aatagaaact	2520
gggcttgctg	agacagagaa	gactcttgcg	tttctgatag	gcacctattg	gtcttactga	2580
catccacttt	gcctttctct	ccacagggtg	ccactcccag	ttcaattaca	gctcttaagg	2640
ctagagtact	taatacgact	cactataggc	tagcctcgag	aattcacgcg	tggtagcgag	2700
ctcggaacca	ctagtaacgg	ccgccagtgt	gctggaattc	tgagatatc	catcacactg	2760
gcgccgcgtc	gagcatgcat	ctagagggcc	ctattctata	gtgtcaccta	aatgctagag	2820
ctcgctgac	agcctcgact	gtgccttcta	gttgccagcc	atctgttggt	tgccccccc	2880
ccgtgccttc	cttgacctg	gaagggtgca	ctcccactgt	ccttttctaa	taaaatgagg	2940
aaattgcata	agattgtctg	agtagggtgc	attctattct	ggggggtggg	gtggggcagg	3000
acagcaaggg	ggaggattgg	gaagacaata	gcaggcatgc	tggggatgcg	gtgggtctta	3060
tggcttctga	ggcggaagaa	accagtcgac	tcgaagatct	gggcgtgggt	aagggtggga	3120
aagaatata	aagggtggggg	tcttatgtag	ttttgtatct	gttttgacgc	agccgcgcgc	3180
gccatgagca	ccaactcggt	tgatggaagc	attgtgagct	catatttgac	aacgcgcag	3240
cccccatggg	ccgggggtgcg	tcagaatgtg	atgggctcca	gcattgatgg	tcgccccgtc	3300
ctgcccgcga	actctactac	cttgacctac	gagaccgtgt	ctggaacgcc	gttgagagact	3360
gcagcctccg	ccgccgcttc	agccgctgca	gccaccgccc	gcgggattgt	gactgacttt	3420
gctttctcga	gcccgttgcc	aagcagtgca	gcttcccgtt	catccgcccg	cgatgacaag	3480
ttgacggctc	ttttggcaca	attggattct	ttgaccgggg	aacttaattgt	cgtttctcag	3540
cagctgttgg	atctgcgcca	gcaggtttct	gccctgaagg	cttctctccc	tcccaatgcg	3600
gtttaaaaca	taaataaaaa	accagactct	gtttggattt	ggatcaagca	agtgtcttgc	3660
tgtctttatt	taggggtttt	gcgcgcgcgg	taggcccggg	accagcggtc	tcggtcgttg	3720
agggctctgt	gtattttttc	caggacgtgg	taaagggtgac	tctggatggt	cagatacatg	3780
ggcataagcc	cgtctctggg	gtggaggtag	caccactgca	gagcttcatg	ctgccccgtg	3840
gtgtttaga	tgatccagtc	gtagcaggag	cgctgggctg	ggtgcctaaa	aatgtctttc	3900
agtagcaagc	tgattgccag	gggcaggccc	ttgggtgaag	tgtttataaa	gcgggttaagc	3960
tgggatgggt	gcatacgtgg	ggataatgaga	tgcatcttgg	actgtatttt	taggttggtc	4020
atgttccag	ccatatccct	ccggggattc	atgttctgca	gaaccaccag	cacagtgtat	4080
ccggtgcact	tgggaaattt	gtcatgtagc	ttagaaggaa	atgcgtggaa	gaacttgag	4140
acgcccttgt	gacctccaag	attttccatg	cattcgtcca	taatgatggc	aatgggcca	4200
cgggcgcgcg	cctgggcaaa	gatatttctg	ggatcactaa	cgtcatagtt	gtgttccagg	4260

atgagatcgt	cataggccat	ttttacaaag	cgcgggcgga	gggtgccaga	ctcgcggtata	4320
atggttccat	ccggcccagg	ggcgtagtta	ccctcacaga	tttgcatttc	ccacgctttg	4380
agttcagatg	gggggatcat	gtctacctgc	ggggcgatga	agaaaacggg	ttccggggta	4440
ggggagatca	gctgggaaga	aagcagggtt	ctgagcagct	gcgacttacc	gcagccgggtg	4500
ggcccgtaaa	tcacacctat	taccgggtgc	aactggtagt	taagagagct	gcagctgccg	4560
tcattccctga	gcaggggggc	cacttcgtta	agcatgtccc	tgactcgcag	gttttccctg	4620
accaaattccg	ccagaaggcg	ctcgccgccc	agcgatagca	gttcttgcaa	ggaagcaaag	4680
tttttcaacg	gtttgagacc	gtccgcccga	ggcatgcttt	tgagcgtttg	accaagcagt	4740
tccaggcggt	cccacagctc	ggtcacctgc	tctacggcat	ctcgatccag	catatctcct	4800
cgttttcgcg	gttggggcgg	ctttcgctgt	acggcagtag	tcgggtgctcg	tccagacggg	4860
ccaggggtcat	gtctttccac	ggggcgaggg	tcctcgtcag	cgtagtctgg	gtcacgggtga	4920
aggggtgcgc	tccgggctgc	gcgctggcca	gggtgcgctt	gaggctggtc	ctgctgggtgc	4980
tgaagcgctg	ccggtcttcg	ccctgcgcgt	cggccaggta	gcatttgacc	atgggtgcat	5040
agtccagccc	ctccgcggcg	tggcccttgg	cgcgcagctt	gcccttggag	gaggcgccgc	5100
acgaggggca	gtgcagactt	ttgagggcgt	agagcttggg	cgcgagaaat	accgattccg	5160
gggagtaggc	atccgcgcgc	caggccccgc	agacggtctc	gcattccacg	agccagggtga	5220
gctctggccg	ttcgggggtca	aaaaccagggt	ttcccccatg	ctttttgatg	cgtttcttac	5280
ctctggtttc	catgagccgg	tgtccacgct	cggtgacgaa	aaggctgtcc	gtgtccccgt	5340
atacagactt	gagagggagt	ttaaaccgaat	tcaatagctt	gttgcatggg	cggcgatata	5400
aaatgcaagg	tgctgctcaa	aaaatcaggc	aaagcctcgc	gcaaaaaaga	aagcacatcg	5460
tagtcatgct	catgcagata	aaggcaggta	agctccggaa	ccaccacaga	aaaagacacc	5520
attttttctct	caaacatgtc	tgcgggtttc	tgcatataaca	caaaataaaa	taacaaaaaa	5580
acattttaaac	attagaagcc	tgtcttataa	caggaaaaac	aacccttata	agcataagac	5640
ggactacggc	catgccggcg	tgaccgtaaa	aaaactggtc	accgtgatta	aaaagcacca	5700
ccgacagctc	ctcgggtcatg	tccggagtca	taatgtaaga	ctcggtaaac	acatcagggtt	5760
gattcatcgg	tcagtgtctaa	aaagcgaccg	aaatagcccg	ggggaataca	taccgcgagg	5820
cgtagagaca	acattacagc	ccccatagga	ggtataacaa	aattaatagg	agagaaaaaac	5880
acataaacac	ctgaaaaaac	ctcctgccta	ggcaaaaatag	caccctcccc	ctccagaaca	5940
acatacagcg	cttcacagcg	gcagcctaac	agtcagcctt	accagtaaaa	aagaaaaacct	6000
attaaaaaaa	caccactcga	cacggcacca	gctcaatcag	tcacagtgtg	aaaaagggcc	6060
aagtgcagag	cgagtataa	taggactaaa	aaatgacgta	acggtttaaag	tccacaaaaa	6120
acaccagaa	aaccgcacgc	gaacctacgc	ccagaaaacga	aagccaaaaa	accacaaact	6180
tcctcaaatac	gtcacttccg	ttttcccacg	ttacgtaact	tcccatttta	agaaaaactac	6240
aattcccaac	acatacaagt	tactccgccc	taaaacctac	gtcacccgcc	ccgttcccac	6300
gccccgcgcc	acgtcacaaa	ctccaccccc	tcattatcat	attggcttca	atccaaaata	6360
aggtatatta	ttgatgatgt	taattaacat	gcatggatcc	atatgcgggtg	tgaataaccg	6420
cacagatgcy	taaggagaaa	ataccgcata	aggcgctctt	ccgcttcctc	gctcactgac	6480
tcgctgcgct	cggtcgttcg	gctgcggcga	gcggtatcag	ctcactcaaa	ggcggttaata	6540
cggttatcca	cagaatcagg	ggataacgca	ggaaagaaca	tgtgagcaaa	aggccagcaa	6600
aaggccagga	accgtaaaaa	ggccgcgttg	ctggcgtttt	tccataggct	ccgccccctt	6660
gacgagcatc	acaaaaatcg	acgctcaagt	cagaggtggc	gaaacccgac	aggactataa	6720
agataccagg	cgtttccccc	tggaaagctcc	ctcgtgcgct	ctcctgttcc	gaccctgccg	6780
cttaccggat	acctgtccgc	ctttctccct	tcgggaagcg	tggcgctttc	tcatagctca	6840
cgctgtaggt	atctcagttc	gggtgtaggtc	gttcgctcca	agctgggctg	tgtgcacgaa	6900
ccccccgttc	agcccgaccg	ctgcgcctta	tccggtaact	atcgtcttga	gtccaacccg	6960
gtaagacacg	acttatcgcc	actggcagca	gccactggta	acaggattag	cagagcgagg	7020
tatgtaggcg	gtgctacaga	gttcttgaag	tgggtggccta	actacggcta	cactagaagg	7080
acagtatttg	gtatctgcgc	tctgctgaag	ccagttacct	tcggaaaaag	agttggtagc	7140
tcttgatccg	gcaaaaaaag	caccgctggt	agcgggtggt	tttttgtttg	caagcagcag	7200
attacgcgca	gaaaaaaaag	atctcaagaa	gatcctttga	tcttttctac	ggggtctgac	7260
gctcagtggg	acgaaaactc	acgttaaggg	atttttggtca	tgagattatc	aaaaaggatc	7320
ttcacctaga	tcctttttaa	ttaaaaatga	agtttttaaat	caatctaaag	tatatatgag	7380
taaacttggt	ctgacagtta	ccaatgctta	atcagtgagg	cacctatctc	agcgatctgt	7440
ctatttcggt	catccatagt	tgcctgactc	cccgtcgtgt	agataactac	gatacgggag	7500
ggcttaccat	ctggccccag	tgctgcaatg	ataccgcgag	acccacgctc	accggctcca	7560
gatttatcag	caataaacca	gccagccgga	agggccgagc	gcagaagtgg	tcctgcaact	7620
ttatccgcct	ccatccagtc	tattaattgt	tgccgggaag	ctagagtaag	tagttcgcca	7680
gttaatatgt	tgcgcaacgt	tgttgccatt	agtcgcagca	tgagattatc	aaaaaggatc	7740
ttcacctaga	tcctttttcac	gtagaaaagc	gctccgcaga	aacgggtgctg	accccgatg	7800
aatgtcagct	actgggctat	ctggacaagg	gaaaacgcaa	gcgcaaagag	aaagcaggta	7860
gcttgacgtg	ggctttacatg	gcgatagcta	gactgggcgg	ttttatggac	agcaagcgaa	7920

ccggaattgc	cagctggggc	gccctctggt	aaggttggga	agccctgcaa	agtaaactgg	7980
atggctttct	cgccgccaag	gatctgatgg	cgcaggggat	caagctctga	tcaagagaca	8040
ggatgaggat	cgtttcgcac	gattgaacaa	gatggattgc	acgcagggtc	tccggccgct	8100
tgggtggaga	ggctattcgg	ctatgactgg	gcacaacaga	caatcggctg	ctctgatgcc	8160
gccgtgttcc	ggctgtcagc	gcagggggcg	ccggttcttt	ttgtcaagac	cgacctgtcc	8220
ggtgccctga	atgaactgca	agacgaggca	gcgcggctat	cgtggctggc	cacgacgggc	8280
gttccttgcg	cagctgtgct	cgacgttgtc	actgaagcgg	gaagggactg	gctgctattg	8340
ggcgaagtgc	cggggcagga	tctcctgtca	tctcaccttg	ctcctgccga	gaaagtatcc	8400
atcatggctg	atgcaatgcg	gcggctgcat	acgcttgatc	cggctacctg	cccattcgac	8460
caccaagcga	aacatcgcac	cgagcgagca	cgtactcgga	tggaaagccg	tcttgctgat	8520
caggatgata	tggacgaaga	gcatcagggg	ctcgcgccag	ccgaactgtt	cgccaggctc	8580
aaggcgagca	tgcccgacgg	cgaggatctc	gtcgtgaccc	atggcgatgc	ctgcttgccg	8640
aatatcatgg	tggaaaatgg	ccgcttttct	ggattcatcg	actgtggccg	gctgggtgtg	8700
gcggaccgct	atcaggacat	agcgttggct	acccgtgata	ttgctgaaga	gcttggcggc	8760
gaatgggctg	accgcttcct	cgtgctttac	ggtatcgccg	ctcccgatcc	gcagcgcata	8820
gcctttctatc	gccttcttga	cgagttcttc	tgaattttgt	taaaattttt	gttaaatcag	8880
ctcatttttt	aaccaatagg	ccgaaatcgg	caacatccct	tataaatcaa	aagaatagac	8940
cgcgataggg	ttgagtgttg	ttccagtttg	gaacaagagt	ccactattaa	agaacgtgga	9000
ctccaacgtc	aaagggcgaa	aaaccgtcta	tcagggcgat	ggcccactac	gtgaaccatc	9060
acccaaatca	agttttttgc	ggtcgaggtg	ccgtaaaagct	ctaaatcgga	accctaaagg	9120
gagccccga	tttagagctt	gacggggaaa	gccggcgaaac	gtggcgagaa	aggaagggaa	9180
gaaagcgaaa	ggagcgggcg	ctagggcgct	ggcaagtgtg	gcggtcacgc	tgcgcgtaac	9240
caccacaccc	gcgcgcttaa	tgcgccgcta	cagggcgcgct	ccattcgcca	ttcaggatcg	9300
aattaattct	taagtttttb	taacatcatc	aataatatac	cttatttttg	attgaagcca	9360
atatgataat	gaggggggtg	agtttgtgac	gtggcgcggg	gcgtgggaac	ggggcggggtg	9420
acgtagtagt	gtggcggaag	tgtgatgttg	caagtgtggc	ggaacacatg	taagcgacgg	9480
atgtggcaaa	agtgaagttt	ttggtgtgcg	ccggtgtaca	caggaagtga	caatttttcgc	9540
gcggttttag	gcggatgttg	tagtaaat	gggcgtaacc	gagtaagatt	tggccatttt	9600
cgcgggaaaa	ctgaataaga	ggaagtga	tctgaataat	tttgtgttac	tcatagcgcg	9660
taataactg						9668

Patentansprüche

1. Rekombinanter viraler Vektor, der ein Insert enthält, das die allgemeine Struktur

tTA - Intron¹ - TK⁺ - TetO₇ - CMV⁺ - Intron² - Transgen

aufweist, wobei

TetO ₇	der heptamerisierte Tetracyclin-Operator ist,
TK ⁺	der minimale Thymidin Kinase-Promotor ist,
tTA	eine Nukleinsäuresequenz ist, die für ein Fusionsprotein aus dem durch Tetracyclin induzierbaren Repressorprotein und der transkriptionellen Aktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus VP16 kodiert,
CMV ⁺	der minimale Cytomegalievirus-Promotor ist und
Transgen	eine für ein nicht-virales Protein kodierende Nukleinsäuresequenz ist,
Intron ¹	eine beliebige nicht-kodierende Nukleinsäuresequenz mit einer Länge von 0 bis etwa 1000 bp ist und
Intron ²	eine beliebige nicht-kodierende Nukleinsäuresequenz mit einer Länge von 0 bis etwa 1000 bp ist.

2. Vektor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Insert in umgekehrter Orientierung in das virale Vektorgenom inseriert ist.

3. Vektor nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Positionen von tTA und Transgen im Insert vertauscht sind.
4. Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Insert zwischen 'CMV⁺' und 'Intron²' oder zwischen 'Intron²' und 'Transgen' zusätzlich einen lac-Repressor (lacR) enthält.
5. Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Transgen eine für ein Fluoreszenzprotein, für Luciferase, Interleukin-12 (IL-12), Interleukin-18 (IL-18), Interleukin-2 (IL-2), Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) oder Interferon- γ (IFN- γ) kodierende Nukleinsäuresequenz ist.
6. Vektor nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß IL-12 ein single-chain Interleukin-12 ist.
7. Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Virus ein Adenovirus, ein Adenoassoziiertes Adenovirus (AAV), ein Retrovirus, insbesondere ein Humanes Immundefizienzvirus (HIV), ein Herpes Simplex Virus, ein Hepatitis-B Virus oder ein Hepatitis C-Virus ist.
8. Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Insert in die E1- und/oder die E3-Region eines rekombinanten Adenovirus einkloniert ist.
9. Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß er durch homologe Rekombination eines

viralen Plasmids und eines Expressionsplasmids mit der in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:3 dargestellten Nukleinsäuresequenz erhältlich ist.

10. Expressionsplasmid mit der in SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:5 dargestellten Nukleinsäuresequenz.
11. Verwendung eines Plasmids nach Anspruch 10 zur Herstellung eines Vektors nach den Ansprüchen 1 bis 9.
12. Verwendung der Vektoren nach den Ansprüchen 1 bis 9 zur in vitro-Genexpression in eukaryoten Zelllinien.
13. Verwendung der Vektoren nach den Ansprüchen 1 bis 9, bei denen 'Transgen' für ein therapeutisch wirksames Protein kodiert, in der Gentherapie.
14. Verwendung nach Anspruch 13, bei dem das Transgen IL-2, IL-12, IL-18, TNF- α oder IFN- γ ist, zur Gentherapie maligner Erkrankungen.
15. Verwendung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die maligne Erkrankung ein solider Tumor ist.
16. Verwendung nach den Ansprüchen 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass man die Genexpression mit Doxycyclin, Tetracyclin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin, Demeclocyclin, Methacyclin oder Minocyclin, reguliert.
17. Verwendung der Vektoren nach den Ansprüchen 1 bis 9, bei denen 'Transgen' für ein Reporterprotein kodiert, zum Nachweis von Tetracyclin oder einem Derivat desselben in

biologischen, lebensmittelchemischen oder ähnlichen Proben.

18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Derivat Doxycyclin ist.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft rekombinante virale Vektoren, die durch Tetracyclin oder Tetracyclin-Derivate, wie z.B. Doxycyclin, hocheffizient supprimiert werden können, sowie deren Verwendung zur Durchführung einer Genexpression in Eukaryontenzellen, insbesondere im Rahmen einer Gentherapie.

Figure 1
Tet-OFF system

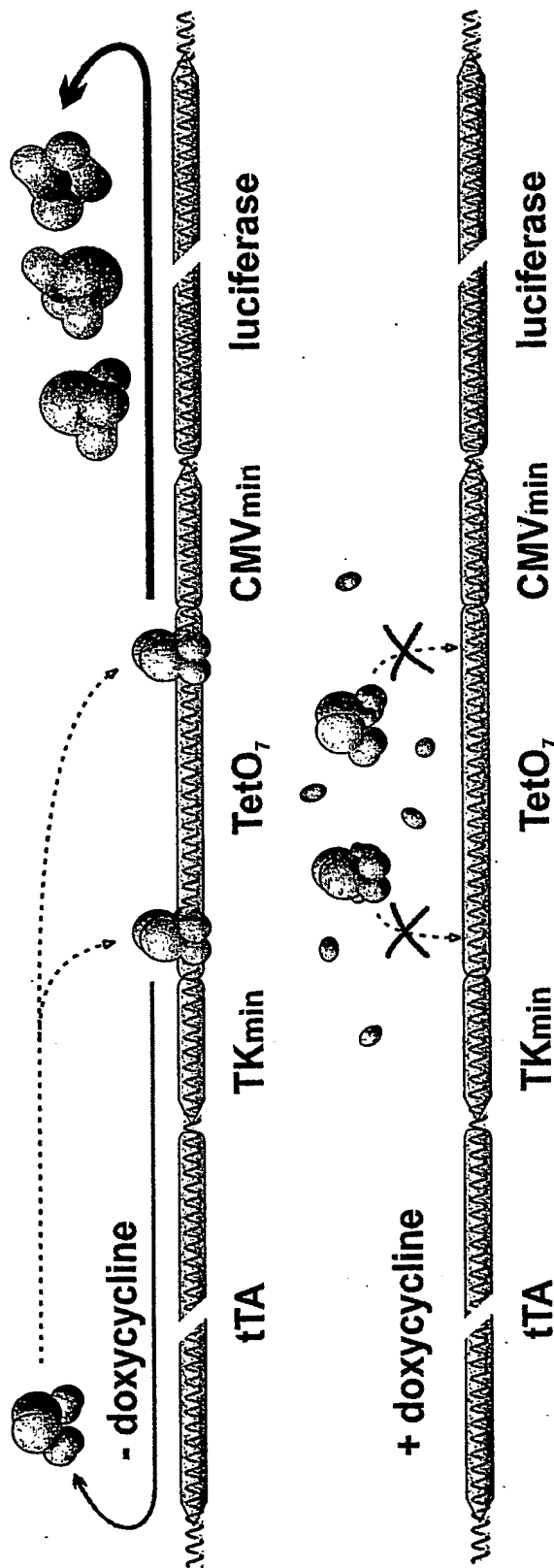


Figure 2

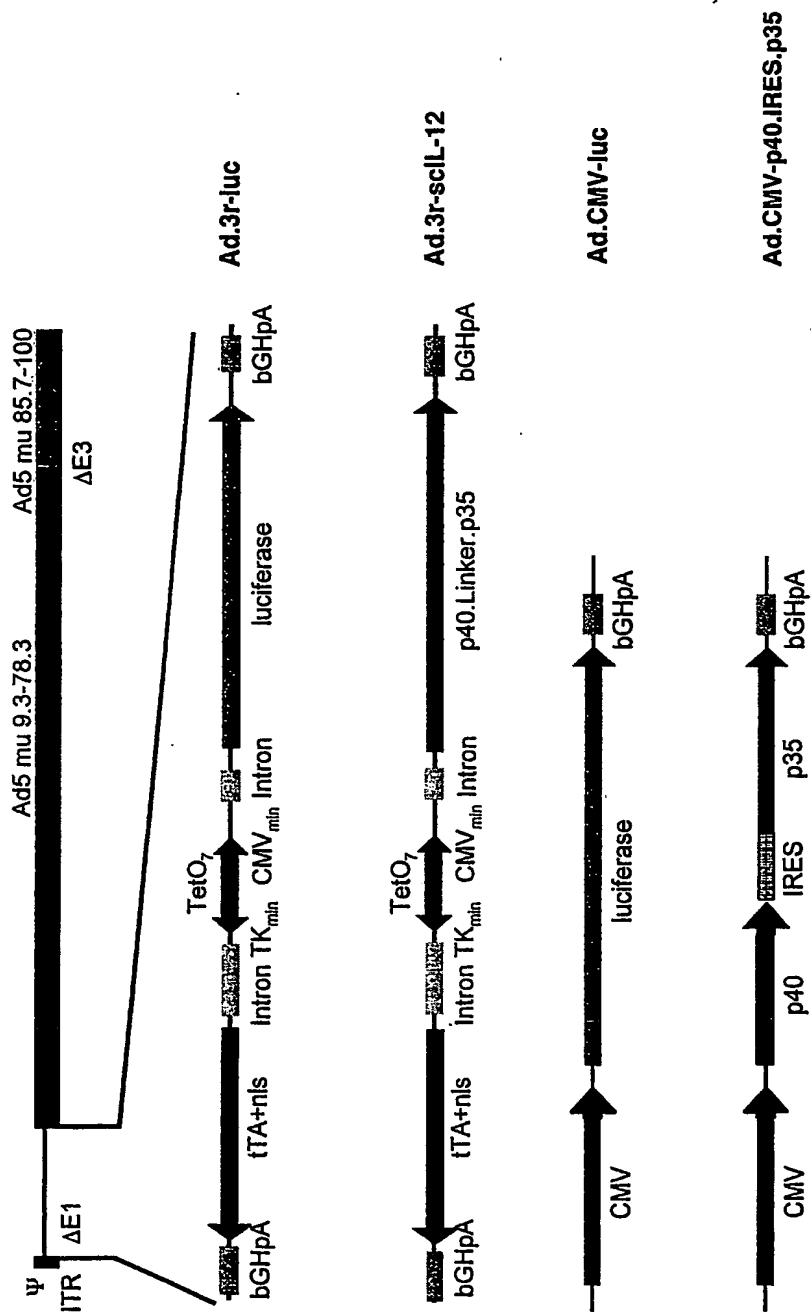


Figure 3

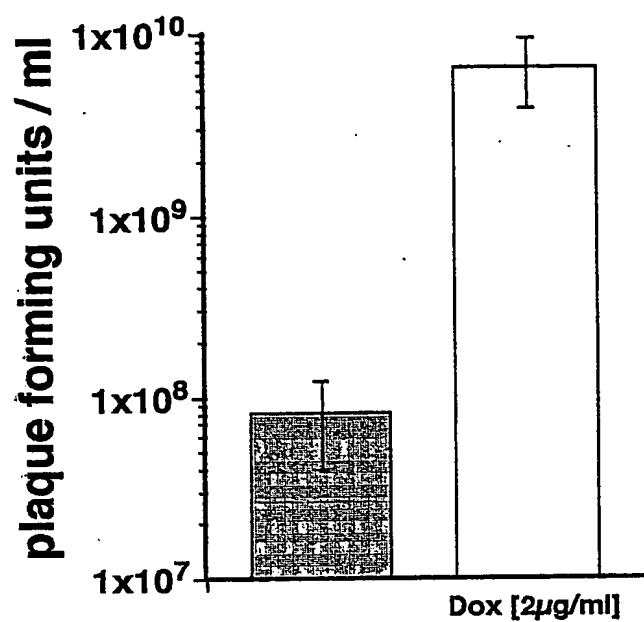


Figure 4

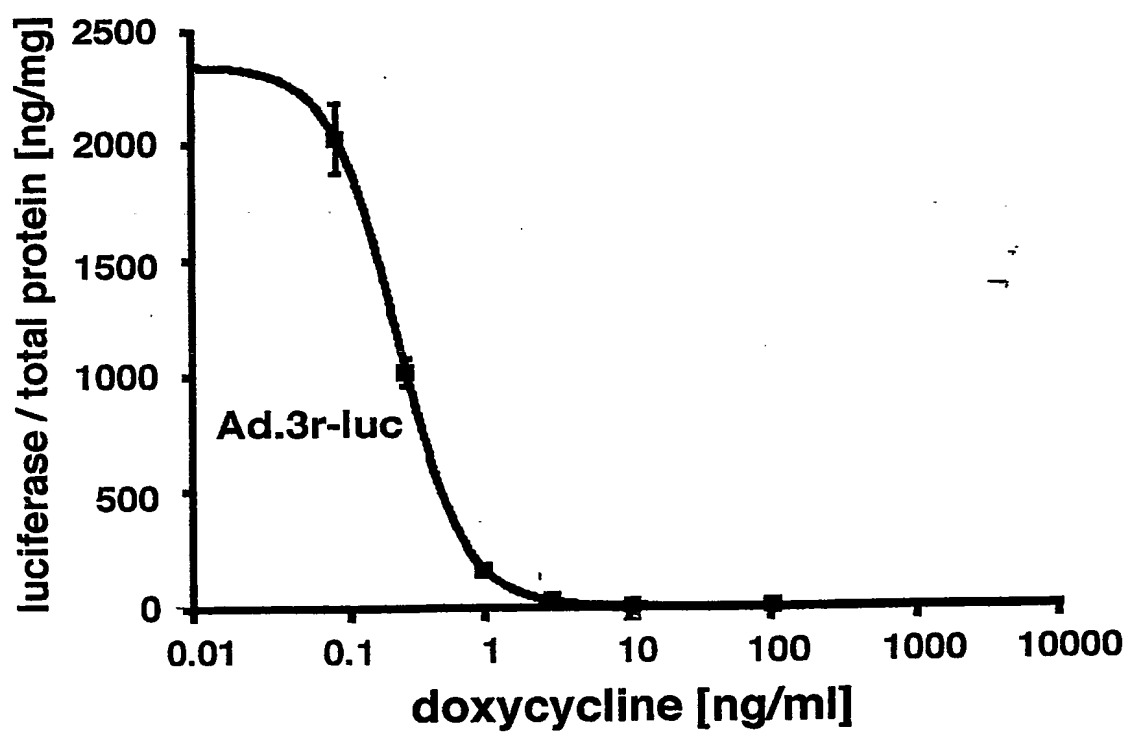


Figure5

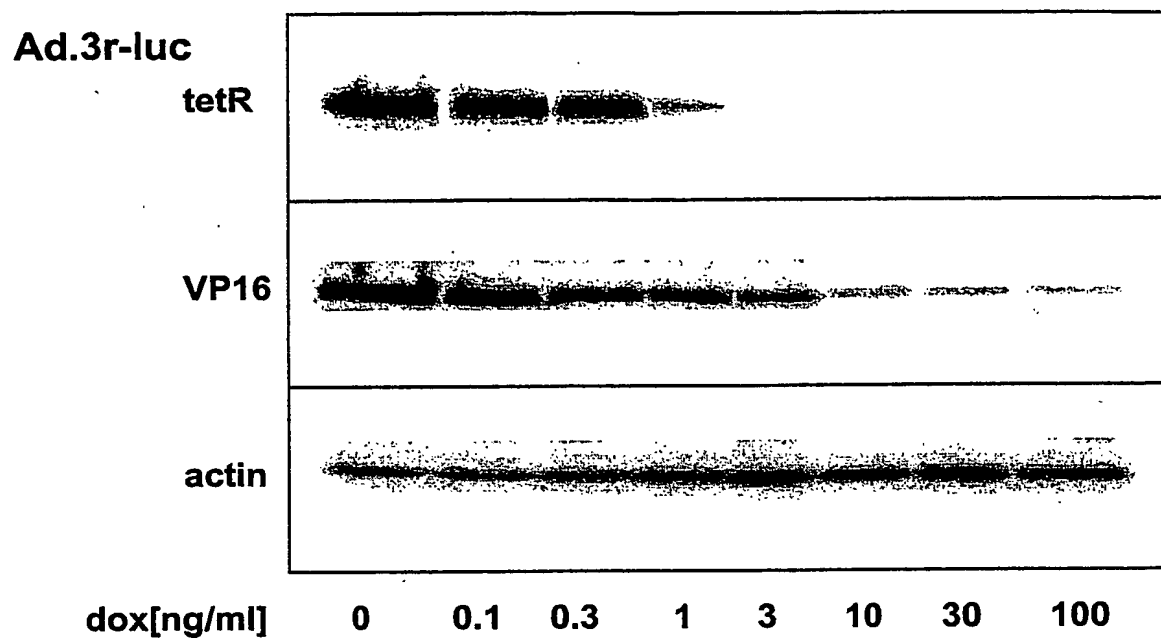


Figure6

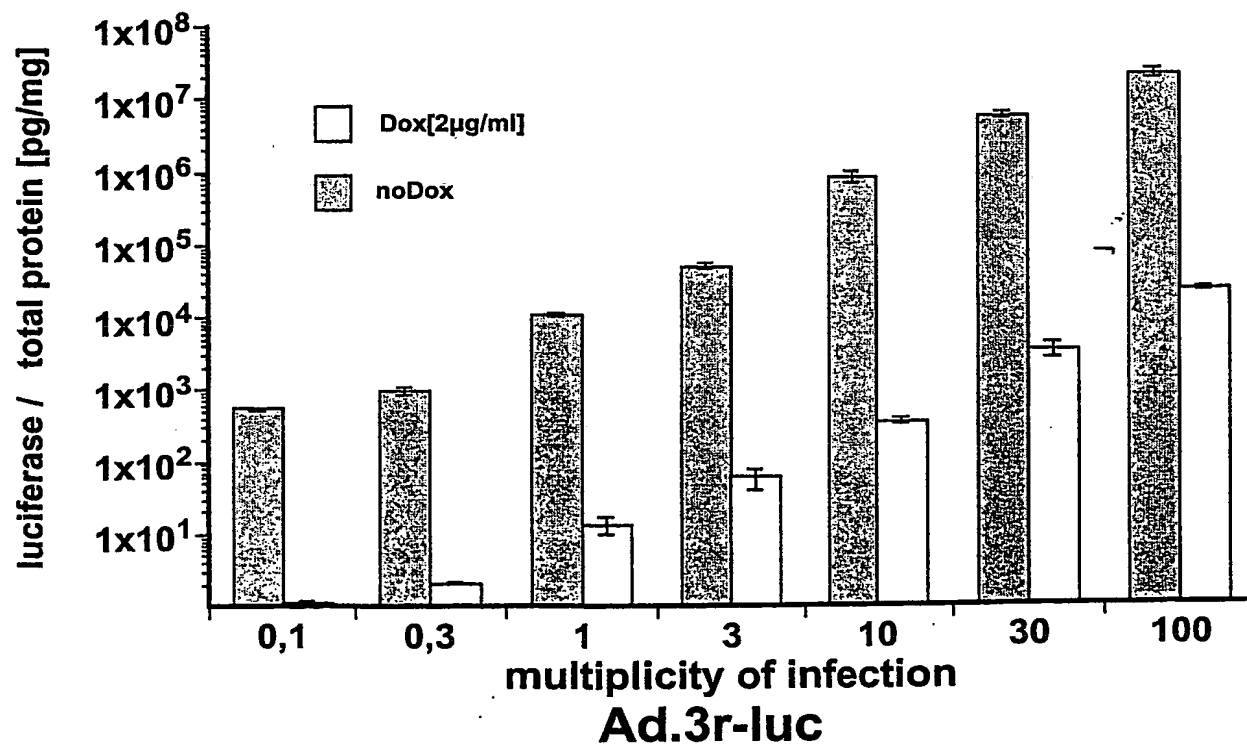


Figure7

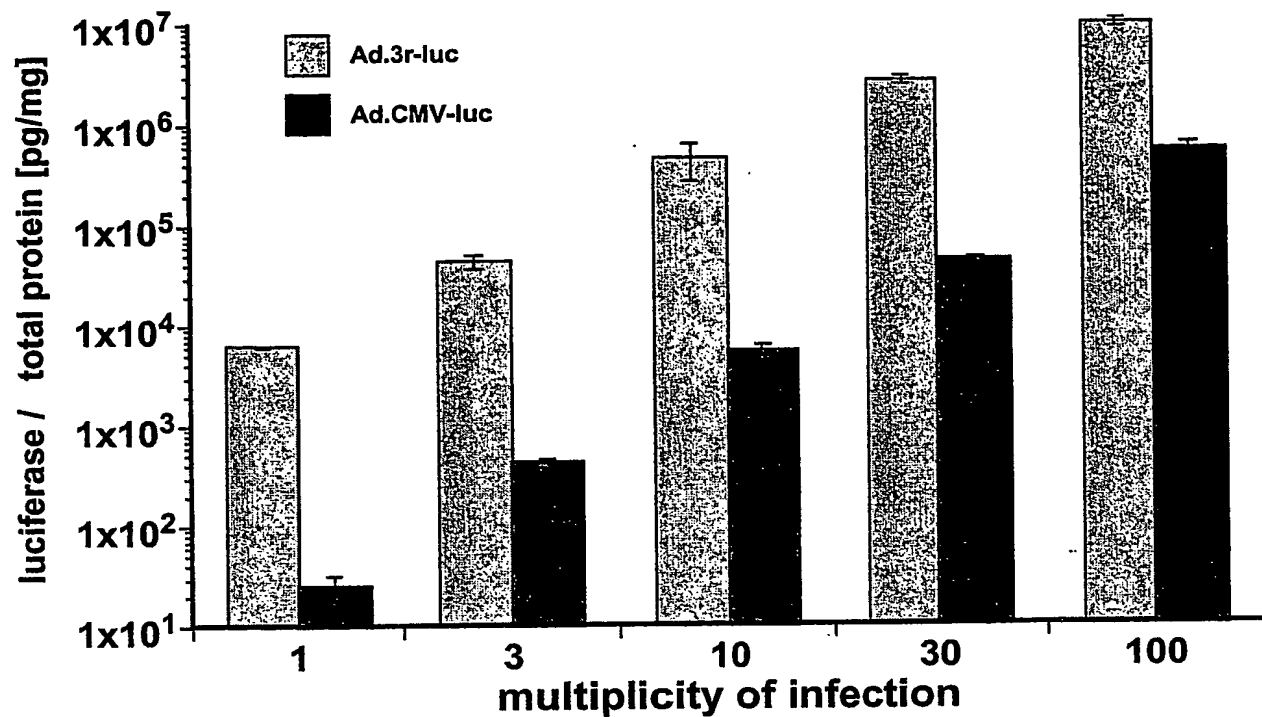


Figure8

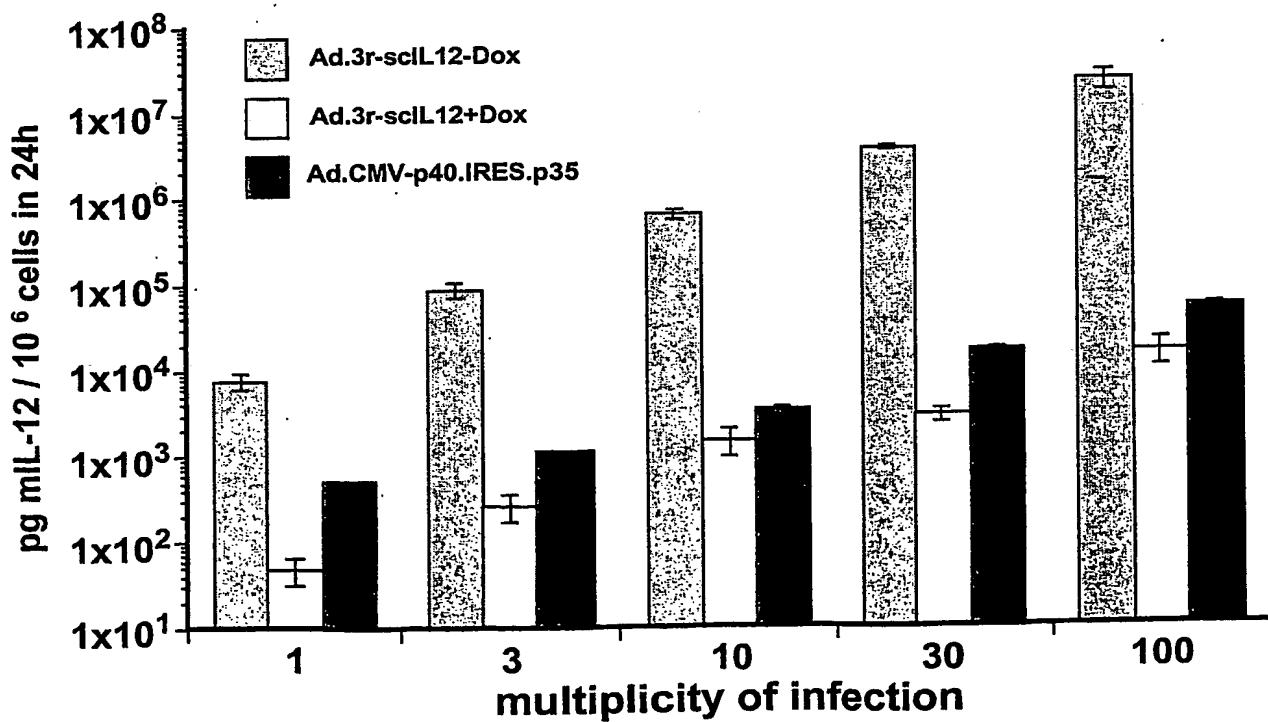


Figure9

Ad.3r-sclL12

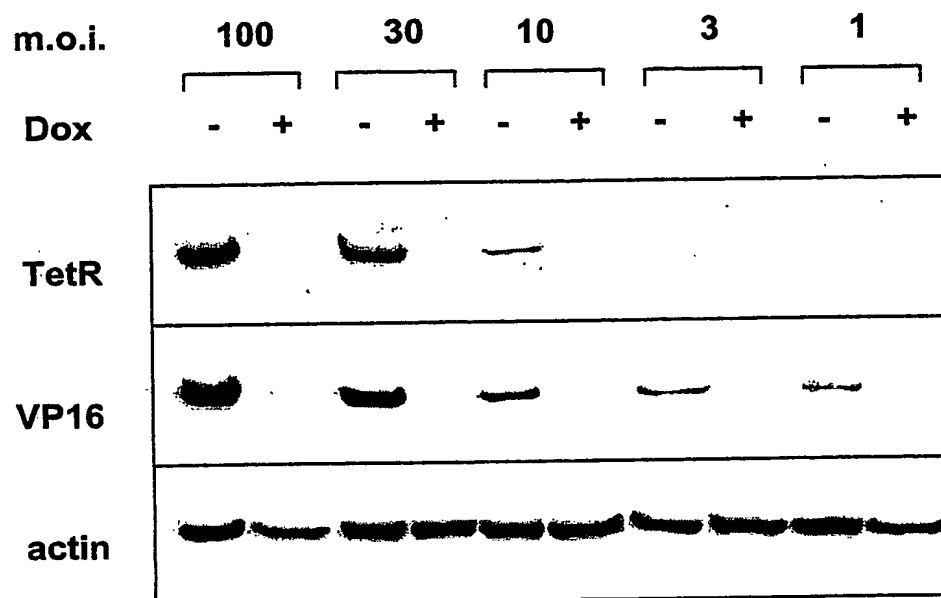


Figure10

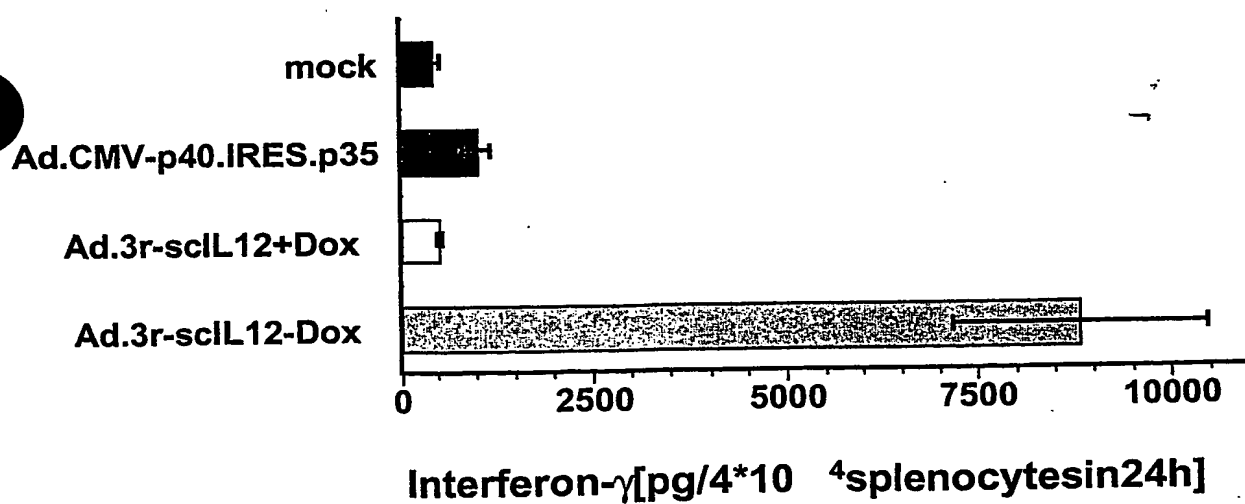


Figure 11

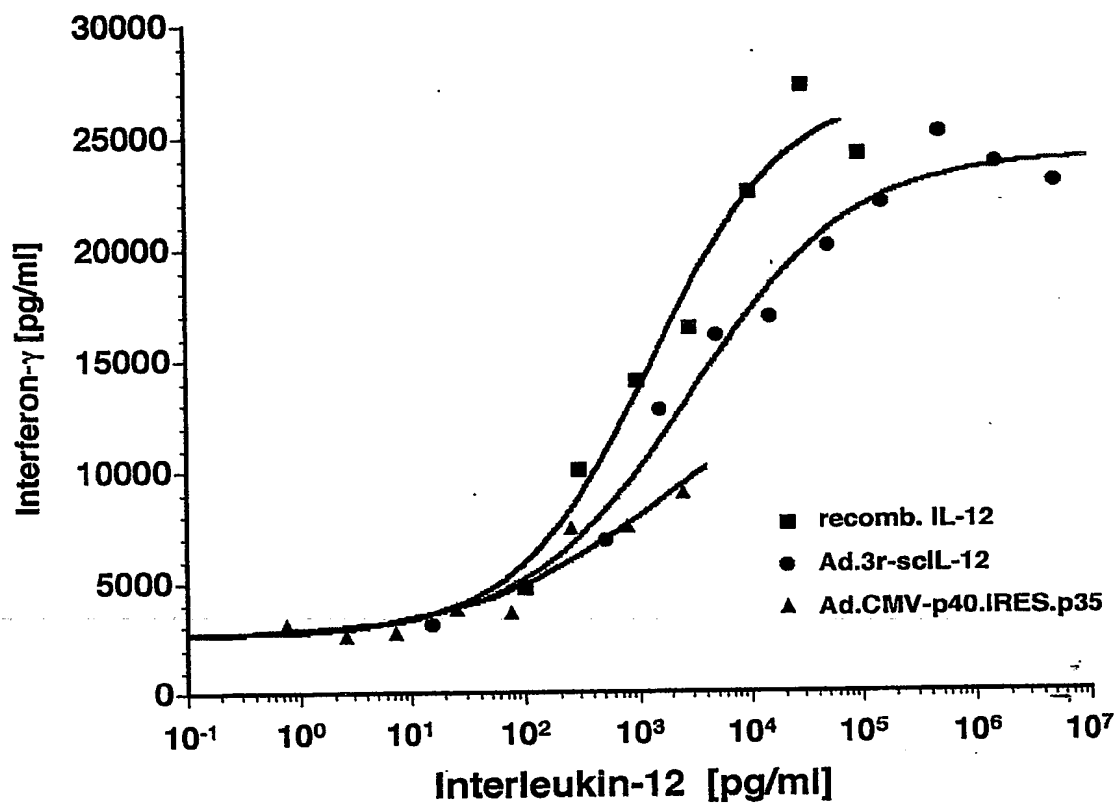


Figure12

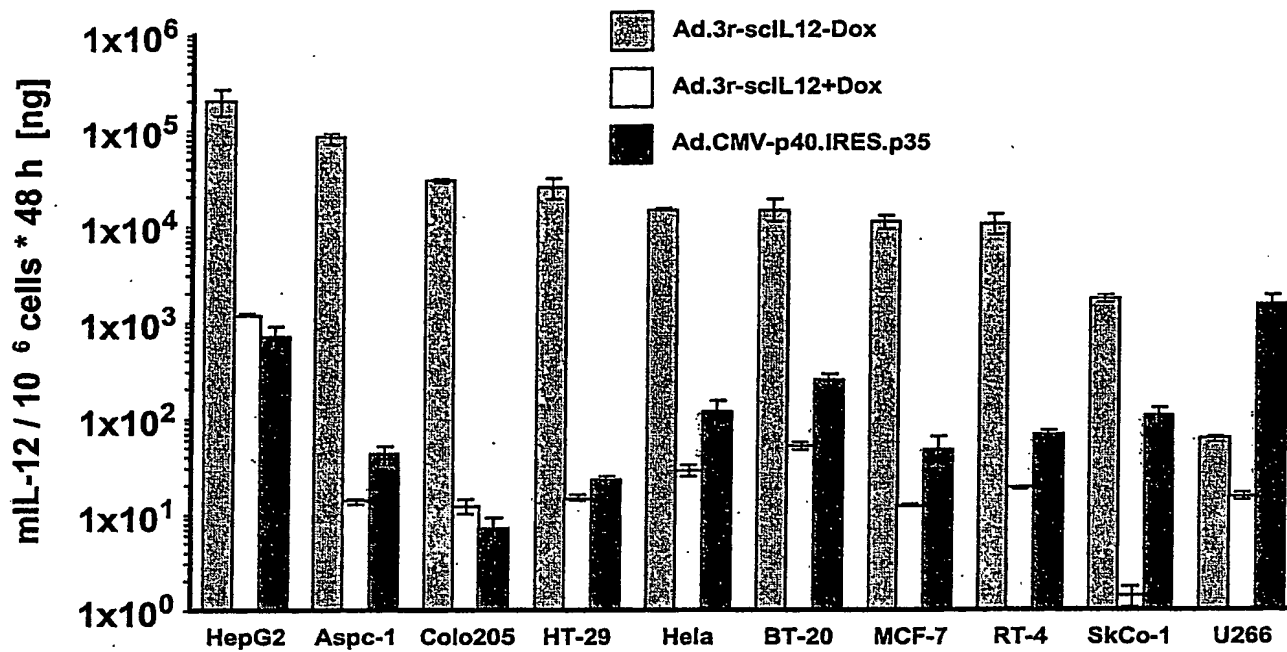
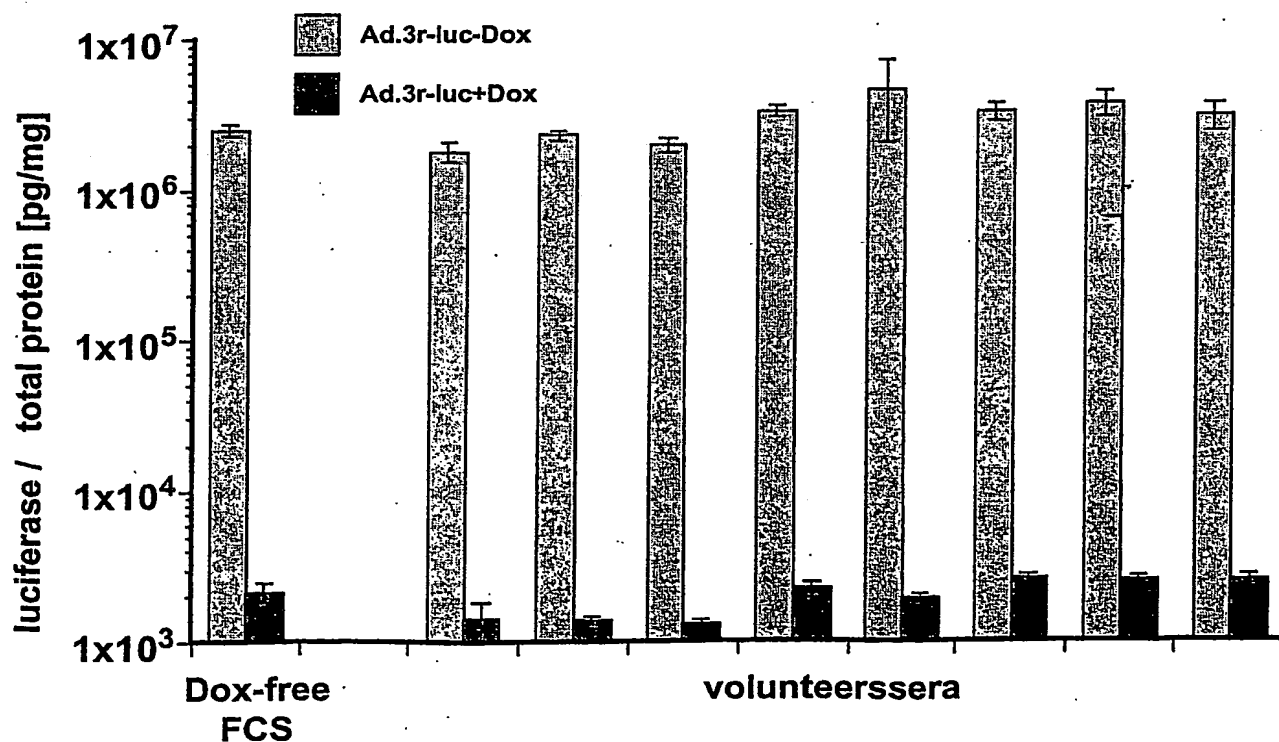


Figure13



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.